

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

BRUNELLA FARO KLIPPEL

**EFEITOS DO KEFIR SOBRE O TÔNUS AUTONÔMICO
CARDÍACO E CONTROLE BARORREFLEXO DA PRESSÃO
ARTERIAL EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

VITÓRIA - ES

2016

BRUNELLA FARO KLIPPEL

**EFEITOS DO KEFIR SOBRE O TÔNUS AUTONÔMICO
CARDÍACO E CONTROLE BARORREFLEXO DA PRESSÃO
ARTERIAL EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^o. Dr. Elisardo Corral Vasquez

VITÓRIA - ES

2016

BRUNELLA FARO KLIPPEL

**EFEITOS DO KEFIR SOBRE O TÔNUS AUTONÔMICO
CARDÍACO E CONTROLE BARORREFLEXO DA PRESSÃO
ARTERIAL EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em ____ de _____ de ____

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº. Dr. Elisardo Corral Vasquez
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profº. Dr. Dalton Valentim Vassallo
Universidade Federal do Espírito Santo
Avaliador interno

Profª. Drª. Marcella Porto Tavares
Instituto Federal do Espírito Santo
Avaliador externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

K65e Klippel, Brunella Faro, 1991 -
Efeitos do Kefir sobre o tônus autonômico cardíaco e
controle barorreflexo da pressão arterial em ratos
espontaneamente hipertensos / Brunella Faro Klippel – 2016.
74 f. : il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.
Coorientador: Silvana dos Santos Meyrelles.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Hipertensão. 2. Produtos Fermentados do Leite.
3. Barorreflexo. 4. Pressão Arterial. 5. Frequência Cardíaca.
I. Vasquez, Elisardo Corral. II. Meyrelles, Silvana dos Santos.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha avó, que sempre me incentivaram a estudar e me apoiaram
em todos os momentos.

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, que certamente trilhou um caminho para mim e me conduziu e me deu forças para continuar.

Ao meu orientador, Professor Dr^o Elisardo Corral Vasquez, que me deu a oportunidade de entrar no mestrado, sem nem mesmo me conhecer, e me recebeu de braços abertos em seu laboratório, nunca me esquecerei disso. Obrigada por todos os seus ensinamentos, pela orientação, por compartilhar a sua história e por ser essa pessoa encantadora e admirável. Me sinto privilegiada em ter sido sua aluna.

À Professora Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles, por sempre compartilhar opiniões, sugestões e ideias para acrescentar o estudo, pelas aulas que nos motivaram e instigaram a aprender mais sobre o assunto, por todos os puxões de orelha, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de descontração (selfies divertidas) que ajudaram bastante a ter dias mais “leves”. Sei que isso tudo é para nos motivar a sermos melhores a cada dia. Obrigada por ser a nossa “Mãe Científica”.

Ao Professor Dr^o Thiago Melo, pelas apaixonantes aulas de fisiologia na graduação e por ter um vasto conhecimento que fez com que eu me encantasse e despertasse interesse pelo assunto e por isso cheguei até aqui.

À Professora Dr^a Bianca Campagnaro e ao Professor Dr^o Tadeu Andrade, pela colaboração e esforço e por dividir o Kefir com a gente.

Ao Professor Dr^o Eduardo Dantas, por toda prontidão e paciência que teve em me ajudar a resolver problemas com a análise espectral, à distância.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, por passarem um pouco do conhecimento de vocês em excelentes aulas e contribuírem para o meu crescimento.

À minha família, que sempre me incentivou a continuar estudando e me deu forças nos momentos difíceis. Aos meus pais, que sempre fizeram de tudo para que eu tivesse uma boa educação, estiveram ao meu lado em todos os momentos e compreenderam os momentos de ausência. À minha irmã, que se tornou minha melhor amiga e sempre está ao meu lado, me ajudando, implicando e apoiando. À minha avó, pela preocupação, cuidado e interesse por mim.

Ao meu noivo Marcello por estar ao meu lado durante essa jornada e compreender tudo. Obrigada pelas palavras de incentivo, pelos momentos em que só de estar ao seu lado já aliviava a tensão. Pelo amor e carinho e por acreditar em mim.

Ao Marquinho, por ter se tornado praticamente meu co-orientador, que sempre me ajudou em tudo desde o início. Sempre demonstrando interesse em ajudar e estimulando o meu aprendizado. Você foi parte fundamental para que eu conseguisse chegar até aqui.

À Jamila, que sempre me aconselhou, me estimulou e me ajudou. Seja ficando comigo no laboratório até de madrugada ou com sábias palavras para me direcionar e acalmar. Obrigada por ter se tornado minha amiga e parceira de estudos. Com você, tudo ficou muito mais agradável e menos difícil.

Às minhas amigas Fabiana, Francelle, Juliana, Dany, Lorranny e Jéssica, que sempre estão comigo me incentivando e apoiando, mesmo não entendendo nada do que eu falava sobre o trabalho, mas sempre demonstrando interesse e me dando forças e conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Translacional, Thais, Laís, Rossana, Victor, Vinícios, Brenna, Lícia, Fran, Alan, João e Eduardo por terem feito parte dessa difícil caminhada e terem transformado tudo mais prazeroso por estarmos sempre juntos. Por terem se preocupado comigo, por me ouvirem, por me aconselharem, por sempre estarem dispostos a me ajudar em tudo, pelos momentos de diversão e descontração. Muito obrigada! Espero levar a amizade de vocês para sempre. E aos demais amigos do LFT, Marcella, Bianca, Ananda, Isabela, Viviane, Andréia, obrigada por fazerem parte dessa história.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação, Cléo, Pollyana, Gírlândia, Carminha, Rafa, Renatinha, Fabrício, Suelen, pelos gritos, papos e risadas pelos corredores.

Ao CNPq, pelos recursos financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

Objetivo: Estudos têm demonstrado que o probiótico Kefir apresenta efeitos benéficos no tratamento da hipertensão arterial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do tratamento crônico com Kefir sobre o tônus autonômico cardíaco e o barorreflexo arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Metodologia:** Ratos Wistar e SHR machos com 4 meses de idade foram divididos em 3 grupos Wistar, SHR e SHR-Kefir tratados por 60 dias com Kefir (0,3ml/100g), por gavagem. Os animais foram anestesiados e cateteres implantados na artéria e veia femoral para injeção de drogas e registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), respectivamente. A contribuição relativa dos tônus autonômicos cardíacos, parassimpático e simpático foi estimada em animais acordados através de injeções *in bolus* de N-metil-atropina (2mg/kg) e de atenolol (2mg/kg), respectivamente. A frequência cardíaca intrínseca (FCI) foi estimada após o duplo bloqueio com os fármacos acima. A sensibilidade do barorreflexo foi testada nos animais acordados por meio de aumentos ou diminuições da pressão arterial (25 mmHg), através de injeção *in bolus* de fenilefrina (5 µg/kg) e nitroprussiato de sódio (40 µg/kg), sob bloqueio da atropina e atenolol 24 e 48 h depois, respectivamente. As análises da variabilidade da pressão arterial (VPA) e variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foram feitas por meio de análise espectral, método autorregressivo, no domínio do tempo (variância da pressão sistólica e dos intervalos R-R) e da frequência (muito baixa, baixa e alta frequência, VLF, LF, HF, respectivamente). Ao fim dos experimentos, o coração e rins foram retirados e pesados para análise de hipertrofia. **Resultados:** Como esperado o grupo SHR apresentou PAS, PAD, PAM e FC (204 ± 8 , 144 ± 4 , 167 ± 4 mmHg e 355 ± 9 bpm, $p < 0,05$, respectivamente) elevadas, quando comparados com ratos Wistar (140 ± 8 , 88 ± 2 , 104 ± 2 mmHg e 328 ± 12 bpm, respectivamente). O tratamento com Kefir atenuou significativamente esses parâmetros (169 ± 8 , 116 ± 6 , 134 ± 6 mmHg e 324 ± 12 bpm, respectivamente). O grupo SHR mostrou hipertrofia ventricular esquerda ($22 \pm 1,4$ mg/mm, $p < 0,05$) quando comparado com ratos Wistar ($17,1 \pm 1,4$ mg/mm, $p < 0,05$). E o tratamento com Kefir foi capaz de reduzir essa hipertrofia quando normalizado pelo comprimento da tíbia ($19 \pm 1,2$ mg/mm, $p < 0,05$) nos ratos SHR tratados. O tônus vagal no grupo Wistar foi de +120 bpm e +40 bpm no grupo SHR. O Kefir recuperou parcialmente o tônus vagal (+90 bpm) dos ratos SHR tratados. O tônus simpático no grupo wistar foi de -30 bpm

e -90 bpm no grupo SHR. Nos ratos SHR tratados com Kefir o tônus simpático foi reduzido para -25 bpm. A sensibilidade do barorreflexo estava significativamente diminuída no grupo SHR (reflexo de bradicardia ~50%) bem como a contribuição relativa dos componentes vagal e simpático cardíaco quando comparados com o grupo Wistar. Nos ratos SHR tratados com Kefir, tanto o reflexo de bradicardia (~40%) quanto o ganho (~35%) melhoraram significativamente. O bloqueio com atropina basicamente aboliu o reflexo de bradicardia e o ganho do barorreflexo de maneira semelhante nos 3 grupos. O grupo SHR mostrou diminuição no reflexo de taquicardia (38%, $p<0,05$) e redução no ganho (32%, $p<0,05$), quando comparado com o grupo Wistar. Nos ratos tratados com Kefir essas respostas melhoraram (~8% e ~12%, $p<0,05$, respectivamente). O bloqueio com atenolol reduziu a taquicardia reflexa em SHR quando comparado com Wistar e normalizou nos SHR tratados com Kefir ($7\pm2,8$, $14\pm2,4$ e $12\pm2,4$ bpm, respectivamente), efeito semelhante foi observado no ganho ($0,26\pm0,10$, $0,53\pm0,11$ e $0,46\pm0,12$ bpm/mmHg, respectivamente). A VFC e a FC-LF estavam maiores nos animais SHR (730 ± 150 ms² e 82 ± 10 ms²) quando comparadas com ratos Wistar (247 ± 46 ms² e 39 ± 9 ms²) e SHR tratados com Kefir (478 ± 80 ms² e 56 ± 10 ms²). Não houve diferenças na comparação dos resultados de FC-HF entre os três grupos estudados. Tanto a VPA quanto a PA-LF aumentaram significativamente nos ratos SHR (73 ± 9 mmHg² e 13 ± 2 mmHg²) quando comparados com ratos Wistar (22 ± 3 mmHg² e $3,7\pm0,4$ mmHg²). O tratamento com Kefir reduziu esses valores (65 ± 8 mmHg² e 8 ± 2 mmHg²). Por fim, a análise do barorreflexo espontâneo mostrou diminuição significativa na sensibilidade do grupo SHR ($1,36\pm0,09$ ms²/mmHg) quando comparado com o grupo Wistar ($1,75\pm0,11$ ms²/mmHg). O tratamento com Kefir não melhorou esta sensibilidade ($1,48\pm0,09$ ms²/mmHg). **Conclusão:** Após 60 dias de tratamento com Kefir, os animais SHR apresentaram diminuição da PAS, PAD e PAM, além de redução da hipertrofia cardíaca. Além disso, o tratamento com Kefir também reverteu parcialmente a perda do tônus vagal, o aumento do tônus simpático e a disfunção barorreflexa dos animais hipertensos.

Palavras chave: 1. hipertensão arterial 2. kefir 3. barorreflexo 4. tônus autonômico cardíaco 5. variabilidade da pressão arterial 6. variabilidade da frequência cardíaca

ABSTRACT

Objective: Studies have shown that the probiotic Kefir has beneficial effects on the treatment of hypertension. The aim of this study was to evaluate the effect of chronic treatment with Kefir on cardiac autonomic tone and arterial baroreflex in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods:** Male Wistar and SHR rats at 4 months of age, were separated into 3 groups Wistar, SHR and SHR-Kefir treated for 60 days with Kefir (0,3ml/100g) by gavage. The animals were anesthetized and catheters were implanted in the femoral artery and vein for drugs injection and pulsatile arterial blood pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) records, respectively. The relative contribution of parasympathetic and sympathetic cardiac autonomic tone, were estimated in conscious animals via bolus injections of N-methyl-atropine (2 mg/kg) and atenolol (2mg/kg), respectively. The intrinsic heart rate (IHR) was estimated after double blockade with the drugs cited above. The baroreflex sensitivity was tested in conscious animals through increases or decreases in blood pressure (25 mmHg) by bolus injections of phenylephrine (5 mg/kg) and sodium nitroprusside (40 mg/kg) under atropine and atenolol blockade 24 and 48 h later. The analysis of blood pressure (BPV) and heart rate variability (HRV) was performed through spectral analysis, autoregressive method in the time domain (variance of systolic pressure and RR intervals) and frequency domain (very low, low and high-frequency, VLF, LF, HF, respectively). At the end of experiment, the heart and kidneys were removed and weighed to hypertrophy analysis. **Results:** As expected the SHR group had higher levels of SBP, DBP, MAP and HR (204 ± 8 , 144 ± 4 , 167 ± 4 mmHg and 355 ± 9 bpm, $p<0.05$, respectively) compared to Wistar rats (140 ± 8 , 88 ± 2 and 104 ± 2 mmHg 328 ± 12 bpm, respectively). Kefir treatment significantly attenuated these parameters (169 ± 8 , 116 ± 6 , 134 ± 6 mmHg and 324 ± 12 bpm, respectively). SHR group showed left ventricular hypertrophy (22 ± 1.4 mg/mm, $p<0.05$) when compared with Wistar rats (17.1 ± 1.4 mg/mm, $p<0.05$). And treatment with Kefir reduced this hypertrophy when normalized by tibia length (19 ± 1.2 mg/mm, $p<0.05$) in SHR. The vagal tone in Wistar group was +120 bpm and +40 bpm in SHR group. Kefir partially recovered vagal tone (+90 bpm) in treated SHR. The sympathetic tone in Wistar group was bpm -30 and -90 bpm in SHR group. In Kefir treated SHR rats sympathetic tone was reduced to -25 bpm. The baroreflex sensitivity was significantly decreased in SHR group (bradycardic reflex ~50%) as well as the relative contribution of vagal and cardiac sympathetic

components when compared to the Wistar group. In the SHR rats treated with Kefir both bradycardic reflex ($\sim 40\%$, $p < 0.05$) and the gain (-35%) were significantly improved. Atropine blockade abolished the bradycardic reflex and baroreflex gain equally in the 3 groups. The SHR group showed a decrease in tachycardic reflex (38% , $p < 0.05$) and gain decrease (32% , $p < 0.05$) when compared with Wistar group. In Kefir treated rats these responses were improved ($\sim 8\%$ and $\sim 12\%$, $p < 0.05$, respectively). Atenolol blockade reduced reflex tachycardic in SHR when compared with Wistar and SHR treated with Kefir the normalized (7 ± 2.8 , 14 ± 2.4 and 12 ± 2.4 bpm), similar effects were observed in gain (0.26 ± 0.10 , 0.53 ± 0.11 and 0.46 ± 0.12 bpm/mmHg, respectively). HRV and HR-LF were higher in SHR (730 ± 150 ms² and 82 ± 10 ms²) when compared with Wistar (247 ± 46 ms² and 39 ± 9 ms²) and SHR rats treated with Kefir (478 ± 80 ms² and 56 ± 10 ms²). There were no differences when comparing the FC-HF results among the three groups. Both VBP and BP-LF showed a significant increase in SHR group (73 ± 9 mmHg², 13 ± 2 mmHg²) when compared to Wistar rats (22 ± 3 mmHg² and 3.7 ± 0.4 mmHg²). Kefir treatment reduced these values (65 ± 8 mmHg² and 8 ± 2 mmHg²). Finally, analysis of spontaneous baroreflex showed a sensitivity decrease in the SHR group (1.36 ± 0.09 ms²/mmHg) compared with Wistar group (1.75 ± 0.11 ms²/mmHg). Kefir treatment did not improve this sensitivity (1.48 ± 0.09 ms²/mmHg). **Conclusion:** After 60 days with Kefir treatment, SHR animals showed decreased SBP, DBP and MAP, besides a reduction of cardiac hypertrophy. In addition, Kefir treatment partially reversed the loss of vagal tone, the sympathetic tone increase and baroreflex dysfunction of hypertensive animals.

Keywords: 1. hypertension 2. kefir 3. baroreflex 4. cardiac autonomic tonus 5. blood pressure variability 6. heart rate variability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil, em 2007. AVE: Acidente Vascular Encefálico; DIC: Doença Isquêmica do coração; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica. Fonte: SBC, 2010.

Figura 2. Ilustração esquemática das principais aferências, eferências e órgãos-alvo do controle neural da circulação. Painel superior: barorreceptores localizados nos seios carótídeos e arco aórtico e quimiorreceptores localizados nos corpos carotídeos. O painel inferior mostra uma ilustração esquemática de avaliação da sensibilidade barorreflexo por meio de agentes vasoativos. Fonte: Vasquez et al., 2012.

Figura 3. Fotomicrografias de grãos de Kefir obtidos por meio de câmera digital (a) microscopia eletrônica de varredura do exterior (b-d) e interior (e, f) da superfície de um grão de Kefir. Na superfície exterior (c, d) encontramos a prevalência de bacilos em estreita associação com a matriz polissacarídea (kefiran). Na superfície interior encontramos em forma de bastonete os bacilos que crescem em associação com leveduras (e, f). Fonte: Friques et al., 2015.

Figura 4. Cronograma de experimentos.

Figura 5. Registro típico da medida da pressão artéria pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um rato Wistar acordado.

Figura 6. Esquema resumido do protocolo de avaliação do tônus autonômico cardíaco.

Figura 7. Esquema resumido do protocolo de avaliação da sensibilidade do barorreflexo.

Figura 8. (A) Registros típicos da PAS, PAM e FC e (B) efeito da administração crônica de Kefir na pressão arterial em animais controle, hipertenso e hipertenso tratado. PAS: Pressão Arterial Sistólica, PAD: Pressão Arterial Diastólica, PAM: Pressão Arterial Média e FC: Frequência Cardíaca. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=8 por grupo). *p<0,5 comparado com o grupo Wistar, #p<0,05 comparado com SHR não tratado (ANOVA uma via).

Figura 9. Efeito da administração crônica de Kefir sobre a hipertrofia cardíaca em animais controle, hipertenso e hipertenso tratado, utilizando o peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal (gráfico da esquerda) e comprimento da tíbia (gráfico da direita). Os valores estão expressos como médias±EPM (n=8 por grupo). *p<0,5 comparado com o grupo Wistar, #p<0,05 em comparação com SHR não tratado (ANOVA de uma via).

Figura 10. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre o tônus autonômico cardíaco dos animais SHR. Como mostrado no esquema (painel direito), o tônus vagal cardíaco foi determinado pelo bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina, o tônus simpático foi determinado pelo bloqueio dos receptores β 1-adrenérgicos com atenolol e o marcapasso ou frequência cardíaca intrínseca (FCI) foi determinado pelo duplo bloqueio da atividade vagal e simpática. Os valores estão expressos como médias±EPM (n=11 a 12 por grupo). *p<0,05 vs. grupo Wistar; #p<0,05 vs. SHR não tratados.

Figura 11. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre o reflexo de bradicardia em SHR comparado com SHR não tratados e ratos Wistar normotensos. Nos três grupos de animais acordados, a fenilefrina induziu aumentos semelhantes (~25 mmHg) na PA. Os experimentos foram realizados antes e após o bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina. Os valores estão expressos como médias±EPM (n=10 a 12 por grupo). *p<0,05 vs. grupo Wistar; #p<0,05 vs. SHR não tratado.

Figura 12. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre o reflexo de taquicardia em SHR comparado com SHR não tratados e ratos Wistar normotensos. Nos três grupos de animais acordados, o nitroprussiato de sódio induziu semelhante diminuição (~25 mmHg) na PA. Os experimentos foram realizados antes e após o bloqueio dos receptores β 1-adrenérgico com atenolol. Os valores estão expressos como médias±EPM (n=10 a 12 por grupo). *p<0,05 vs. grupo Wistar; #p<0,05 vs. SHR não tratado.

Figura 13. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre a análise espectral da frequência cardíaca e pressão arterial em SHR comparado com SHR não tratado e ratos Wistar normotensos. Os valores estão expressos como médias±EPM (n=10 a 12 por grupo). *p<0,05 vs. grupo Wistar; #p<0,05 vs. SHR não tratado.

Figura 14. Resumo dos efeitos benéficos da administração crônica de Kefir no controle autonômico e disautonomia cardiovascular em SHR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal, peso cardíaco e comprimento da tíbia dos animais Wistar, SHR não-tratado e SHR tratados por 60 dias com Kefir.

Tabela 2. Efeito do tratamento crônico com Kefir sobre a variabilidade da FC e PA em SHR.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Ang II: Angiotensina II

ANOVA: Análise de Variância

AVE: Acidente Vascular Encefálico

CO₂: Dióxido de Carbono

CVLM: *Caudal Ventrolateral Medulla* (Bulbo Ventrolateral Caudal)

DCV: Doenças Cardiovasculares

DIC: Doença Isquêmica do Coração

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

EPM: Erro Padrão da Média

EPS: Polissacarídeo Extracelular

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FC: Frequência Cardíaca

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HF: *High Frequency* (Alta Frequência)

Hz: Hertz

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IP: Intervalo de Pulso

KCN: Cianeto de Potássio

LF: *Low Frequency* (Baixa Frequência)

NA: Núcleo Ambíguo

NDMV: Núcleo Dorsal Motor do Vago

NO: Óxido Nítrico

NPS: Nitroprussiato de Sódio

NTS: Núcleo do Trato Solitário

OMS: Organização Mundial da Saúde

PA: Pressão Arterial

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PAM: Pressão Arterial Média

PAP: Pressão Arterial Pulsátil

PAS: Pressão Arterial Sistólica

pH: Potencial Hidrogeniônico

PHE: Fenilefrina

RVLM: *Rostral Ventrolateral Medulla* (Bulbo Ventrolateral Rostral)

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

SBH: Sociedade Brasileira de Hipertensão

SHR: *Spontaneously Hypertensive Rats* (Ratos Espontaneamente Hipertensos)

SNC: Sistema Nervoso Central

SRAA: Sistema Renina Angiotensina-Aldosterona

SUS: Sistema Único de Saúde

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

VLF: *Very Low Frequency* (Muita Baixa Frequência)

VPA: Variabilidade da Pressão Arterial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Hipertensão arterial	15
1.2 Regulação da pressão arterial	18
1.3 Barorreflexo	20
1.4 Kefir	23
1.5 Justificativa	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Gerais	28
2.2 Específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Identificação, preparação e administração do kefir	29
3.3 Instrumentação para medidas hemodinâmicas	30
3.4 Avaliação do tônus autonômico cardíaco	32
3.5 Sensibilidade farmacológica do barorreflexo	33
3.6 Análise espectral	34
3.7 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	35
4.1 PA e FC basal em animais acordados	35
4.2 Hipertrofia cardíaca	35
4.3 Tônus autonômico cardíaco	38
4.4 Análise farmacológica clássica da função do barorreflexo	38
4.5 Análise espectral	40
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo, estimando 31% das mortes anuais (WHO, 2013). Dentre os fatores de risco para as DCV, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) se destaca por ser um dos mais importantes (Kearney et al., 2005). Cerca de 40% da população mundial, aproximadamente 1 bilhão de pessoas, foram diagnosticados com hipertensão em 2008 (WHO, 2013). No Brasil, 29,4% das mortes registradas em 2007 foram devidas às DCV, sendo que 12,8% foram causadas por HAS (figura 1) (SBC, 2010).

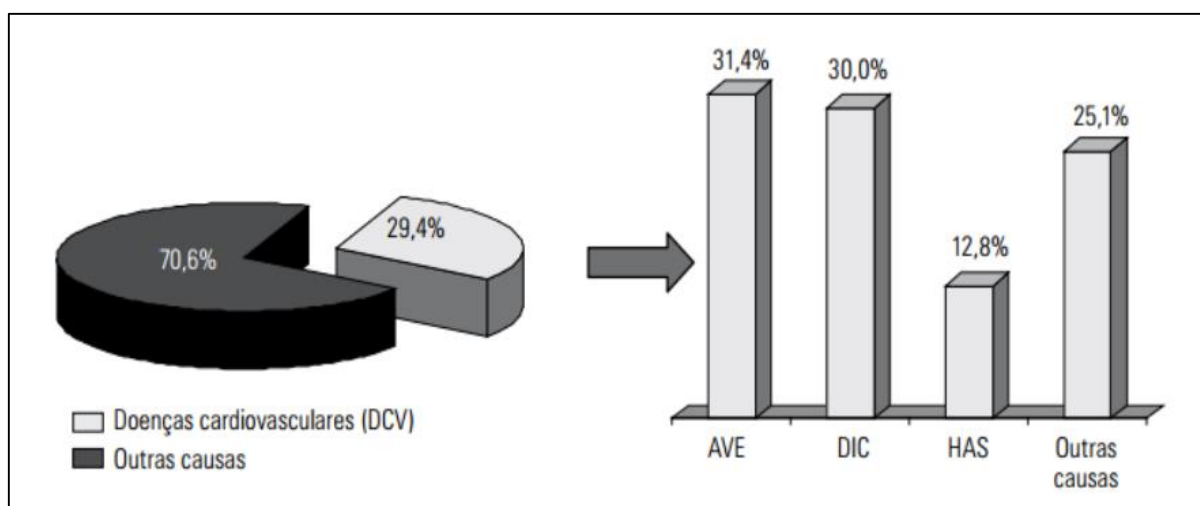


Figura 1. Taxas de mortalidade por DCV e suas diferentes causas no Brasil, em 2007. AVE: Acidente Vascular Encefálico; DIC: Doença Isquêmica do coração; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica. Fonte: SBC, 2010.

A HAS é uma doença crônica determinada por elevados níveis de pressão sanguínea nas artérias, fazendo com que o coração exerça um esforço maior do que o normal para bombear o sangue através dos vasos sanguíneos (Anadón et al., 2010). É causada pela interação de diversos fatores que envolvem a função cardíaca, o volume sanguíneo, a regulação de sal, o tônus vascular periférico e a função endotelial (Varin et al., 2000; Chapman et al., 2004) e é caracterizada por níveis elevados e sustentados de PA (Pressão Sistólica ≥ 140 mmHg; Pressão Diastólica ≥ 90 mmHg) (SBC, 2010).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial, tem-se a idade, o gênero, a etnia, a obesidade, a taxa de ingestão de sal, o consumo de bebidas alcoólicas, o sedentarismo, fatores socioeconômicos e o tabagismo (SBC, 2010;

WHO, 2013). O aumento da pressão sanguínea torna-se então um importante fator de risco para doença cerebrovascular, doença arterial coronária, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades (SBH, 2004). Essa multiplicidade de consequências caracteriza a HAS como uma das causas de maior redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (Duncan et al., 2006).

Muitas pessoas não são diagnosticadas nas fases iniciais da doença, mesmo já apresentando a pressão arterial elevada e sustentada, pois a HAS raramente causa sintomas nessas fases. Além disso, muitos pacientes não conseguem controlar com êxito a doença em longo prazo por não terem acesso ao tratamento (Bernatova, 2014).

Apesar dos esforços na tentativa de desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da HAS, sua causa permanece desconhecida em 90 a 95% dos pacientes que apresentam pressão arterial elevada, caracterizando a hipertensão como essencial ou primária. Quando a pressão arterial é elevada secundária a algum fator conhecido, é caracterizado como hipertensão arterial secundária, apresentando prevalência de 5 a 10% (Lewandowski, 2003; Yan et al., 2014).

Pessoas com hipertensão essencial apresentam uma média aumentada de 40 a 60% da PA e aumento da resistência vascular periférica total, fluxo sanguíneo renal diminuído com a progressão da doença, aumento na resistência ao fluxo sanguíneo renal (apesar da filtração glomerular se encontrar próxima ao normal) e prejuízo na excreção renal de sal e água. Outros fatores ainda podem ocorrer com o desenvolvimento da doença, como a ativação do sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA), aumento do estresse oxidativo decorrente do excesso da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuição na produção de óxido nítrico (NO), redução das vias antioxidantes fisiológicas, além de haver alterações no controle reflexo fisiológico da PA (Montezano & Touyz, 2012; Botelho-Ono et al., 2011).

Por causa da similaridade na fisiopatogenia com a hipertensão essencial primária no homem, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) têm sido utilizados como uma ferramenta importante para a compreensão da hipertensão arterial e outras disfunções cardiovasculares, bem como para a identificação de agentes alternativos ou não-farmacológicos para a prevenção/tratamento destas doenças (Monteiro et al., 2012; Friques et al, 2015; Barbosa Neto et al, 2013; Ceroni et al., 2009).

A hipertensão no SHR se desenvolve após 12-14 semanas de vida, e está associada a um aumento da resistência periférica total e débito cardíaco normal ou diminuído. Estudos mostraram que nos SHRs as alterações das propriedades funcionais precedem o desenvolvimento da hipertensão arterial e que a redução da distensibilidade e complacência vascular nos animais jovens resultam em uma hipertrofia da camada média, em vez de alterações intrínsecas das propriedades elásticas dos vasos (Fazan et al., 2001; Doggrell & Brown, 1998). Outra característica relevante deste modelo de hipertensão essencial é um controle nervoso autônomo anormal da frequência cardíaca (FC) e PA (Monteiro et al., 2012; Barbosa Neto et al., 2012; Ceroni et al., 2009), que está estreitamente correlacionada com lesão de órgãos alvos (Su et al., 2005; Abboud 2010; Abboud et al., 2012).

A importância do sistema nervoso no desenvolvimento do SHR foi demonstrada por meio da redução da pressão arterial, em resposta à ablação cirúrgica ou farmacológica do sistema nervoso autônomo simpático, da prevenção do desenvolvimento da hipertensão por imunossimpatectomia, da simpatectomia química e outros métodos. Existe, portanto, uma ampla documentação de uma hiperatividade simpática no modelo SHR (Fazan et al., 2001; Doggrell & Brown, 1998).

Apesar de algumas discrepâncias, uma série de estudos sobre a variabilidade da FC e da PA, por meio de análise espectral, demonstraram no SHR um tônus parassimpático cardíaco (vagal) diminuído, um tônus simpático cardíaco aumentado e um tônus vasomotor simpático aumentado quando comparados com ratos Wistar normotensos (Ceroni et al., 2009; Barbosa Neto et al., 2013; Silva et al., 2009; Hayward et al., 2012).

Também tem sido demonstrado que a sensibilidade barorreflexa está diminuída em modelos experimentais de hipertensão essencial (Barbosa Neto et al., 2013) e secundária (Moysés et al., 1994a; Campagnaro et al., 2012).

1.2 REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A PA é caracterizada pela força exercida pelo sangue contra as paredes dos vasos e é responsável pela manutenção da perfusão sistêmica adequada. É determinada pela combinação entre o débito cardíaco e a resistência vascular periférica. O gradiente de pressão é o que impulsiona o sangue ao longo da circulação. Então, a pressão que o

sangue exerce sobre as paredes dos vasos depende do volume de sangue a ser ejetado e da resistência encontrada na circulação (Silva, 2010).

É importante manter a PA dentro de uma faixa de normalidade, e isso depende de variações no débito cardíaco, na resistência vascular periférica, ou de ambos. Diferentes mecanismos de controle participam não só na manutenção como na variação momento a momento dos níveis pressóricos, regulando o calibre e a distribuição de fluidos nos vasos e o débito cardíaco (Irigoyen et al., 2001).

A regulação neural autonômica da circulação através do sistema simpático e parassimpático fornece para os órgãos uma perfusão ideal, de acordo com as suas necessidades metabólicas (Vasquez et al., 2012). No coração podem ser liberadas tanto noradrenalina como acetilcolina, modificando o débito cardíaco por alterar a força de contração das fibras miocárdicas e a frequência cardíaca (FC). Nos vasos de resistência, a noradrenalina modifica o estado contrátil do músculo liso vascular, ou seja, a resistência vascular periférica (Silva, 2010).

Os mecanismos neurais são de grande importância na regulação da função cardiovascular. O sistema nervoso simpático exerce uma ação excitatória no coração e vasos sanguíneos, enquanto que a inervação parassimpática cardiovagal exerce uma ação inibidora sobre o coração (Campagnaro, 2012). A manutenção (componente tônico) bem como a variação momento a momento (componente fásico) dependem de mecanismos complexos que determinam ajustes apropriados da frequência e contratilidade cardíaca, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos sanguíneos (Mengal, 2015).

Nesse contexto, sabe-se que três reflexos neurais estão envolvidos na modulação autonômica cardiovascular. Estes reflexos detectam e corrigem as alterações na pressão arterial sanguínea (reflexo barorreceptor), do volume de sangue (receptores cardiopulmonares) e alterações específicas do oxigênio, da tensão de dióxido e do pH (quimiorreceptores arteriais) (Irigoyen et al., 2003; Vasquez et al., 1997).

O reflexo barorreceptor arterial (ou barorreflexo) é um dos mecanismos mais poderosos e rápidos para controlar PA, promovendo momento a momento uma regulação do tipo retroalimentação negativa da PA e opondo-se, assim, a grandes

flutuações ou labilidade da PA e as consequências adversas de tais flutuações. Um aumento imediato na PA provoca um aumento reflexo da atividade vagal cardíaca e uma diminuição da atividade simpática cardíaca e vascular, resultando em uma diminuição da FC e na correção da PA. Por outro lado, em resposta a uma queda da PA, a atividade cardiovagal é inibida e a atividade simpática cardíaca e vascular é aumentada, causando um aumento da FC e um ajuste da PA (Vasquez, et al., 2012).

Os reflexos cardiopulmonares têm como estímulo tanto a distensão cardíaca, como também agente químicos. Os receptores destes reflexos estão localizados nos átrios, ventrículos, vasos pulmonares e parênquima pulmonar. O reflexo de Bainbridge é caracterizado por um aumento simultâneo da FC e da PA após uma hipervolemia. Já o reflexo de Bezold-Jarisch é caracterizado por bradicardia e hipotensão simultâneas devido ao aumento da atividade vagal para o coração, e acompanhada de retirada do simpático para os vasos, com consequente queda do débito cardíaco e da resistência vascular periférica (Meyrelles et al, 1994).

Os reflexos dos quimiorreceptores periféricos controlam a respiração e a circulação. Durante a hipóxia, a ativação de quimiorreceptores periféricos localizados nos corpos carotídeos levam a ajustes autonômicos e respiratórios que funcionam para restaurar os níveis de oxigênio à faixa fisiológica normal, primeiramente realizando alterações adequadas da ventilação e em seguida aumentando a PA e FC através da estimulação simpática (Braga et al., 2008).

Além das rápidas respostas neurais (segundos), o organismo também possui o controle humoral da circulação que é feito pela liberação de vários hormônios (parácrinos ou autócrinos) ou agentes químicos de ação local que participam na manutenção dos valores basais da PA, interferindo principalmente na modulação do tono arteriolar. Quando há uma queda sustentada da PA, por exemplo, irá ocorrer maior liberação de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal, maior liberação de vasopressina pela neuro-hipófise e aumento dos níveis plasmáticos de renina. Esses sistemas hormonais prolongam por minutos ou até mesmo horas as respostas cardiovasculares comandadas pelos barorreceptores (Irigoyen et al., 2001; Zhuo et al., 2013).

Apesar da eficiência dos mecanismos neurais e humorais em realizar ajustes apropriados e regular os parâmetros pressóricos, em alguns distúrbios, como na

hipertensão, quando suprimidos ou hiperestimulados, podem contribuir para a gênese e manutenção dos altos níveis pressóricos.

1.3 BARORREFLEXO

Os barorreceptores arteriais são o mais importante mecanismo de controle reflexo, momento a momento, da PA. São mecanorreceptores localizados no arco aórtico e seio carotídeo, que são locais estratégicos, pois se encontram na saída do coração e entrada do cérebro e são especializados em detectar flutuações da PA (figura 2, parte superior) (Vasquez et al., 2012; Irigoyen et al., 2001).

A cada sístole cardíaca, a PA gerada deforma as paredes desses vasos, levando a uma despolarização do baroreceptor, o que leva ao aumento da frequência de potenciais de ação transmitidos pelas fibras aferentes dos nervos depressor aórtico e sinusal, os quais se unem respectivamente aos nervos vago e glossofaríngeo, fazendo sinapse no núcleo do trato solitário (NTS), localizado no bulbo dorsal (Chapleau et al., 1995; Irigoyen et al., 2001; Silva, 2010).

Os neurônios sensoriais fazem sinapse com neurônios do NTS, que excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago (NDMV) e no núcleo ambíguo (NA), que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração. Simultaneamente, neurônios provenientes do NTS se dirigem para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM), o qual envia estímulos inibitórios que irão se projetar para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), que são projetados aos neurônios simpáticos da coluna intermédia lateral (Irigoyen et al., 2001; Vasquez et al., 1997).

Durante elevações da PA, há grande deformação da parede e ativação dos barorreceptores que geram potenciais de ação que são conduzidos para o NTS, aumentando a estimulação no NA e NDMV, desencadeando um aumento da atividade parassimpática. Simultaneamente, existe uma estimulação aumentada sobre o CVLM, aumentando a inibição sobre RVLM, que reduz a atividade simpática. Essas respostas determinarão o aumento da atividade vagal cardíaca, levando a diminuição da FC, da contratilidade cardíaca, da resistência vascular periférica e do retorno venoso, diminuindo a PA reflexamente (figura 2, parte inferior) (Irigoyen et al., 2001; Vasquez et al., 1997; Silva, 2010).

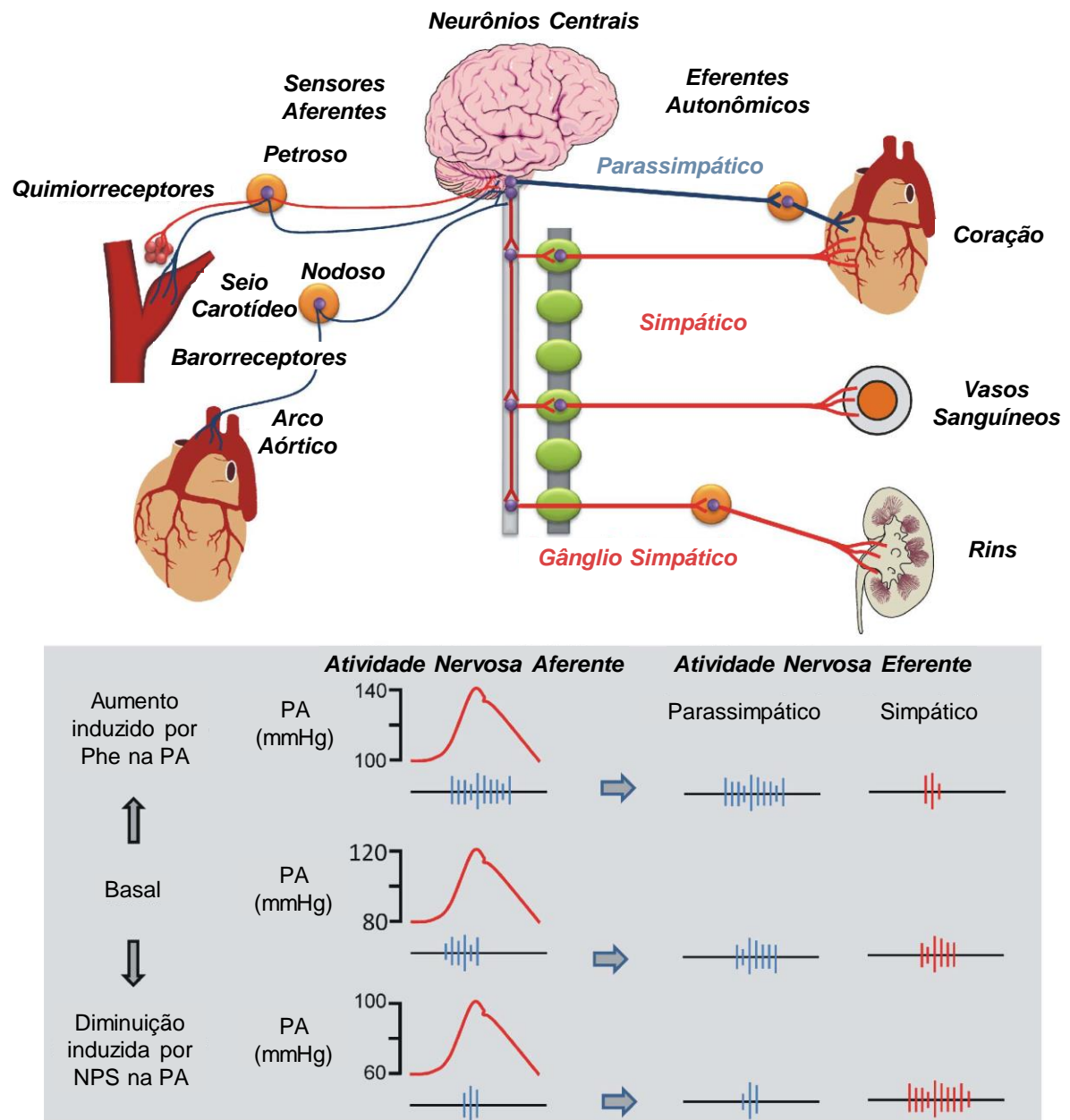


Figura 2. Ilustração esquemática das principais aferências, eferências e órgãos-alvo do controle neural da circulação. Painel superior: barorreceptores localizados nos seios carotídeos e arco aórtico e quimiorreceptores localizados nos corpos carotídeos. O painel inferior mostra uma ilustração esquemática de avaliação da sensibilidade barorreflexo por meio de agentes vasoativos. Fonte: Vasquez et al., 2012.

O oposto acontece frente a reduções nos níveis da PA. Se houver uma diminuição da PA, há uma menor deformação da parede, que geram menos potenciais de ação que são conduzidos para o NTS, havendo uma inibição do NA e NDMV, desencadeando uma diminuição da atividade parassimpática cardíaca. Simultaneamente, CVLM estará menos estimulado, diminuindo a inibição sobre RVLM, que aumenta a atividade simpática cardíaca e vascular. Consequentemente ocorrerá uma diminuição da

atividade vagal, um aumento da FC, da contratilidade cardíaca, da resistência vascular periférica e do retorno venoso, aumentando a PA reflexamente (figura 2, parte inferior) (Irigoyen et al., 2001; Vasquez et al., 1997; Silva, 2010).

Este reflexo tem sido classicamente avaliado através de abordagens invasivas usando vasoconstritores e vasodilatadores (Moysés et al., 1994a; Campagnaro et al., 2012) e, mais recentemente, através de abordagens não-invasivas por meio da análise espectral (Dias da Silva Valdo et al., 2002; Chapleau & Sabharwal, 2011).

A manutenção da regulação da PA momento a momento na hipertensão é possível porque os barorreceptores se adaptam aos níveis elevados de pressão. No entanto, sua eficácia em normotensão para corrigir os desvios para mais e para menos da PA é maior do que em hipertensão. Durante um aumento sustentado da PA, a atividade dos barorreceptores aumenta inicialmente, mas diminui ou se adapta ao longo do tempo, quando a pressão elevada é mantida. Por outro lado, depois de um período de hipertensão aguda, a atividade do barorreceptor é suprimida (depressão pós excitatória) e o limiar de pressão é aumentado em relação a qualquer novo nível sustentado de pressão arterial (reset). A adaptação e o reajuste ocorrem rapidamente dentro de segundos a minutos após o aumento da pressão (Chapleau et al., 2001; Aires, 2012).

A regulação da PA é uma das funções fisiológicas mais complexas do organismo, dependendo das ações integradas dos sistemas cardiovasculares, renal, neural e endócrino (Sanjuliani, 2002). Devido a isto, quaisquer alterações nos diferentes sistemas também estão envolvidas na fisiopatologia da hipertensão arterial e, embora seja uma doença bastante comum, muitos de seus mecanismos ainda estão incompreendidos (Silva, 2010).

1.4 KEFIR

Algumas bactérias, isoladamente ou através das mudanças que sofrem durante a fermentação, tem sido relatadas mostrando ter efeitos positivos sobre a saúde, bem como resistência à doenças. O interesse nessas espécies probióticas tem aumentado nos últimos anos à medida que mais se aprende sobre os microrganismos utilizados no processo de fermentação e a possibilidade de adicionar bactérias benéficas em produtos alimentares. Além disso, os consumidores estão cada vez mais visando

melhorar sua saúde e aumentar a sua resistência as doenças através de meios alimentares (Farnworth, 2005).

Probióticos são definidos como: microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas exercem um efeito benéfico à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2001). Ainda há controvérsias sobre os critérios para a seleção de microrganismos probióticos, mas tendo em consideração os mecanismos de ação, duas condições têm sido amplamente aceitas para a seleção: a capacidade de sobreviver no ambiente gastrointestinal e que possua pelo menos uma função benéfica (Diosma et al., 2014).

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado os efeitos benéficos dos alimentos funcionais (Monteiro et al., 2012; Friques et al., 2015), incluindo a diminuição da pressão arterial e a atenuação da disfunção endotelial em SHR tratados cronicamente com estes produtos (Friques et al., 2015). Entre as variedades de alimentos funcionais cientificamente validados disponíveis, um foco importante das investigações são os leites fermentados contendo bactérias ácido lácticas, os chamados probióticos, incluindo o Kefir. Recentemente, demonstramos que o tratamento crônico de ratos SHR com Kefir durante 60 dias foi capaz de diminuir a PA elevada e atenuar a disfunção endotelial em SHR (Friques et al., 2015).

O Kefir atualmente é considerado uma mistura probiótica. É uma bebida fermentada pela ação de bactérias e leveduras que estão associadas simbioticamente nos chamados grãos de Kefir. A bebida tem origem na Ásia central, entre as montanhas Caucasianas e a Mongólia e traz promessas de vários benefícios para a saúde. O nome “Kefir” é provavelmente derivado da palavra turca "keyif", que significa “sentimento bom”. Também é conhecido como *kefyr*, *kephir*, *kefer*, *kiaphur*, *Knapon*, *Kepi* e *Kippi* (Wszolek et al., 2006; Nielsen et al., 2014; Lopitz-Otsoa et al., 2006; Sarkar, 2007).

Segundo a lenda Caucasiana, Mahomet (570-632 a.c.) deu seus grãos juntamente com a receita secreta do Kefir para os habitantes da região. Assim, o Kefir é uma das mais antigas bebidas de leite fermentado, a tecnologia de produção e da utilização de uma cultura específica se desenvolveram através dos tempos (Nielsen et al., 2014; Wszolek et al., 2006).

O Kefir preparado pela fermentação dos grãos em solução aquosa de açúcar mascavo é uma forma bastante consumida pela população brasileira, mas suas propriedades funcionais ainda são pouco relatadas na literatura. A maioria dos estudos utiliza o Kefir tradicional, fermentado em leite (Sakar, 2007)

O sabor, a viscosidade e a composição microbiana e química do produto final do Kefir pode ser afetada pelo tamanho do grão adicionado ao leite, pela ocorrência de qualquer agitação durante a fermentação, pela temperatura e duração da refrigeração e pelas etapas de maturação seguintes a fermentação (Farnworth, 2005). Possui um sabor ligeiramente ácido, aroma de levedura, consistência cremosa, e baixo teor alcoólico (Serafini et al., 2014). E os principais produtos da fermentação do Kefir são o ácido láctico, o etanol e o CO₂, que irão conferir a viscosidade, a acidez e o baixo teor de álcool (Leite et al., 2013).

Os grãos de Kefir variam de tamanho, de 0,3 a 3,0 cm de diâmetro (figura 3), se assemelham a pequenas couves-flores. São caracterizados por uma superfície irregular, multilobular, unidas por uma única secção central, e a sua cor varia de branco a branco amarelado e com odor característico. Os grãos são elásticos e têm uma textura viscosa e firme (Leite et al., 2013; Farnworth, 2005; Wszolek et al., 2006).

Os grãos de Kefir têm uma específica estrutura e função biológica. Quando os grãos são semeados em leite, crescem e passam as suas propriedades para a(s) geração (ões) seguinte(s) de grãos recém-formados. Além disso, a microflora dos grãos de Kefir é bastante estável, mantendo a sua atividade durante anos se preservados e incubados sob condições culturais e fisiológicas adequadas (Wszolek et al., 2006).

Os grãos de Kefir têm uma composição microbiológica complexa, e consistem de uma mistura de bactérias ácido lácticas (aproximadamente 83-90%) e leveduras (aproximadamente 10-17%) (Wszolek et al., 2006). Um estudo feito em nosso laboratório realizou uma análise de microscopia eletrônica de varredura no grão de Kefir e constatou-se que o biofilme presente no grão é composto majoritariamente por bacilos curvos curtos e longos ou por leveduras de forma ovóide. Foi observado também por meio de análise microbiológica, que a microflora dominante do Kefir inclui várias espécies de bactérias benéficas, incluindo bactérias como *Acetobacter aceti*, *Acetobacter* sp., *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc* spp., bem como

Lactobacillus kefirifaciens e leveduras, como *Candida famata* e *Candida krusei*. Possui também uma contagem de microrganismos total de $7,5 \times 10^7$ UFC/mL (Friques et al., 2015).

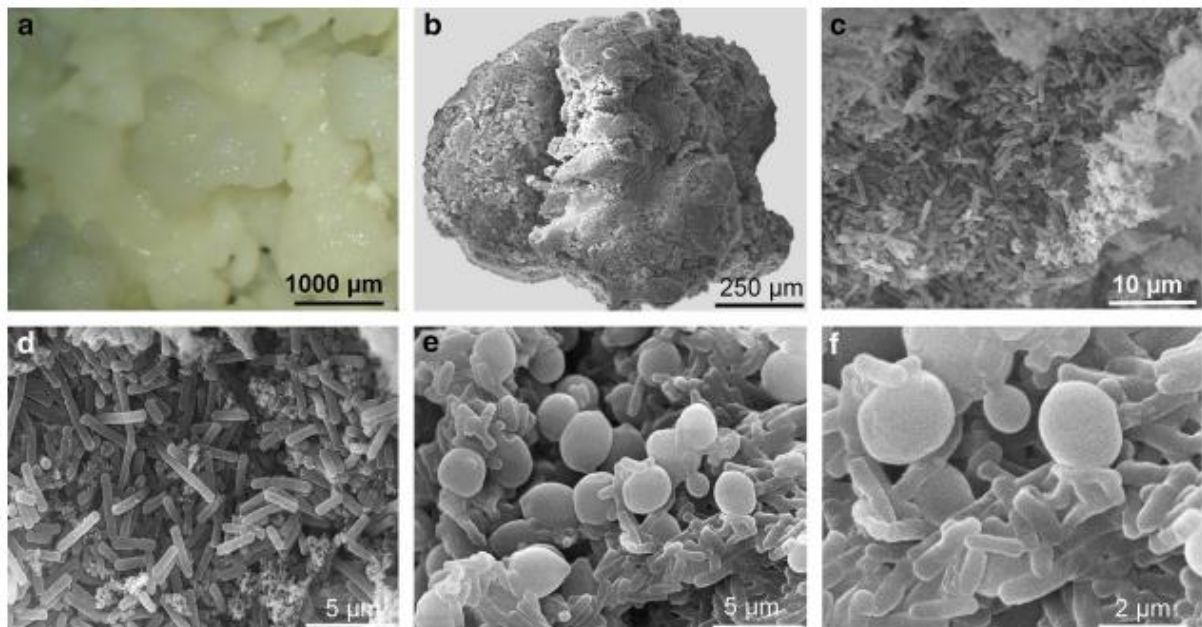


Figura 3. Fotomicrografias de grãos de Kefir obtidos por meio de câmera digital (a) microscopia eletrônica de varredura do exterior (b-d) e interior (e, f) da superfície de um grão de Kefir. Na superfície exterior (c, d) encontramos a prevalência de bacilos em estreita associação com a matriz polissacarídea (Kefiran). Na superfície interior encontramos em forma de bastonete os bacilos que crescem em associação com leveduras (e, f). Fonte: Friques et al., 2015.

Não está claro se todos os grãos de Kefir são provenientes de uma única cultura original, uma vez que a análise microbiológica de amostras de Kefir retirados de locais diferentes indicam diferenças populacionais na microflora (Farnworth, 2005). Leite e colaboradores, 2012, avaliaram a distribuição dos microrganismos a partir de três grãos brasileiros de Kefir e observaram uma variação relativa na sua distribuição de bactérias e leveduras de acordo com a origem do grão. Ainda não há um acordo sobre o arranjo da microflora dentro dos grãos, em alguns casos, a microscopia eletrônica de varredura demonstrou *Lactobacillus* principalmente na parte do exterior do grão de Kefir, e as leveduras, principalmente, na direção do centro. Em áreas onde as leveduras são predominantes, há poucas bactérias e onde os *Lactobacillus* predominam, existem alguns tipos de levedura (Nielsen et al., 2014).

A microflora dos grãos de Kefir são mantidas juntas em uma matriz de proteína de polissacarídeo. Algumas espécies de bactérias ácido lácticas são conhecidos por

produzir polissacarídeos extracelular (EPS), que contribui para a textura do grão e do fermentado. O EPS produzido pelos microrganismos do Kefir é comumente conhecido como Kefiran, que é solúvel em água e é composto por quantidades na proporção de 1:1 de D-glucose e D-galactose. O Kefiran é produzido pelo *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus kefiranofaciens* e essas bactérias podem produzir o kefiran em diferentes condições. (Wszolek et al., 2006; Farnworth, 2005; Lopitz-Otsoa et al., 2006; Nielsen et al., 2014; Leite et al., 2013).

Na literatura há trabalhos relatando diversos efeitos benéficos do Kefir. Um estudo apresentou uma atividade antimicrobiana da suspensão de Kefir, do Kefiran e dos grãos de Kefir contra algumas espécies bacterianas unicelulares e também uma nova atividade antifúngica, além de mostrar boa eficácia na inibição da formação de esporos e produção de aflatoxina B1 de *Aspergillus flavus* (Ismaiel et al., 2011). Fahmy e Ismail, 2015, demonstraram um efeito gastroprotetor contra úlcera gástrica induzida em ratos Wistar fêmeas através de irradiação gama e injeção oral de etanol e observaram que o efeito antiulcerogênico do Kefir pode ser resultante da redução da secreção ácida através da inibição de $H^+K^+ATPase$ e estimulação da secreção de muco, que poderiam ser atribuídos a suas propriedades antioxidantes, atividades anti-apoptóticas e rádio-proteção.

Outro estudo avaliou a cicatrização das lesões de ferimentos de queimaduras em ratos tratados com géis de Kefir e concluíram que a terapia com o gel de Kefir com 96h de fermentação da cultura, melhora os resultados clínicos após a lesão térmica em comparação com o tratamento com sulfadiazina de prata (Huseini et al., 2012). Friques e colaboradores, 2015, demonstraram que o Kefir foi capaz de atenuar a disfunção endotelial em vasos de condutância de animais SHR por meio da diminuição da produção de EROs vascular e, conseqüentemente, restaurar a biodisponibilidade de NO.

Também foi demonstrado que o Kefir apresenta atividade anticarcinogênica (Sakar, 2007), hipocolesterolêmica (Nielsen et al., 2014; Uchida et al., 2010), antialérgica (Hong et al., 2010), melhora da digestão e tolerância à lactose (Hertzler & Clancy, 2003) e também foi demonstrado por Punaro e colaboradores, 2014, uma redução progressiva do prejuízo renal e da hiperglicemia, em ratos diabéticos, pela diminuição do estresse oxidativo.

1.5 JUSTIFICATIVA

O estilo de vida da humanidade nas últimas décadas, estresse, trabalho, alimentação extremamente industrializada e sedentarismo, têm contribuído muito para o surgimento de novos casos de DCV e agravamentos dos já existentes. Nesse contexto, existe um acentuado interesse mundial para melhorar a qualidade da nutrição e reduzir os gastos com saúde por meio da prevenção de doenças crônicas, da melhoria da qualidade e da expectativa de vida ativa. É crescente a preocupação da população pela busca de um estilo de vida mais saudável.

Dessa forma, faz-se necessário, estudos sobre alimentos que possam contribuir para uma melhor qualidade de vida, podendo atuar até mesmo como coadjuvante no tratamento farmacológico utilizado em doenças cardiovasculares.

O presente estudo procurou avaliar os efeitos da administração crônica de Kefir sobre a modulação autonômica cardíaca e vascular em SHR.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a ação do tratamento com Kefir sobre mecanismos da regulação cardiovascular de ratos SHR.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento com Kefir sobre os seguintes desfechos:

- ✓ Na pressão arterial e frequência cardíaca;
- ✓ Hipertrofia cardíaca;
- ✓ Barorreflexo arterial;
- ✓ Tônus autonômico cardíaco;
- ✓ Análise espectral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado em SHR machos, de 4 meses de idade e em ratos Wistar da mesma idade. Os ratos foram alojados no biotério da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil, mantidos em gaiolas de plástico individuais, aclimatizados com uma temperatura controlada (22-23°C), ciclo claro-escuro (12:12-h), e alimentados com ração e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado Animal (CEUA-UFES, protocolo nº 040/2014). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes de cuidado e uso de animais de laboratório, como recomendado pelo National Institutes of Health (NIH).

3.2 IDENTIFICAÇÃO, PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DO KEFIR

A identificação, preparação e administração do Kefir foi como descrito anteriormente (Friques et al., 2015) e aqui descrito resumidamente. O Kefir foi obtido a partir da fermentação dos grãos em leite integral e as bactérias e leveduras foram identificadas utilizando quatro diferentes meios de Agar em condições específicas de temperatura, de atmosfera (aerobiose e anaerobiose) e tempo. A bebida Kefir foi preparada por adição de grãos de Kefir em leite integral pasteurizado em uma proporção de 4% (m/v) e mantidos à temperatura ambiente. Após 24 horas, esta mistura foi filtrada e o produto resultante foi refrigerado a 10°C para permitir o crescimento de leveduras durante 24 horas. Em seguida, o Kefir foi aliqotado em tubos de plástico estéreis e armazenado a -20°C até a sua utilização.

A análise microbiológica das amostras aleatórias de grãos utilizados no presente estudo, mostraram uma microflora dominante do Kefir, que incluiu várias bactérias, conhecidas por possuírem efeito benéfico (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter* sp., *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc* spp.), bem como *Lactobacillus kefiranofaciens*, e leveduras (*Candida famata*, *Candida krusei*).

Um grupo de SHR foi tratado com Kefir (0,3mL/100g de peso corporal, por gavagem) durante 60 dias. Em outro grupo de SHR foi administrado leite integral (0,3ml/100g, pH ajustado para 4,5) durante 60 dias para serem utilizados como controle hipertenso.

Os ratos Wistar receberam leite integral por 60 dias e foram utilizados como grupo controle normotenso (figura 4). A razão para tratar os animais com Kefir por 60 dias, foi baseada em um estudo anterior (Friques et al., 2015), que demonstrou que o tratamento menor que 60 dias, não teve efeito sobre os parâmetros cardiovasculares em SHR.

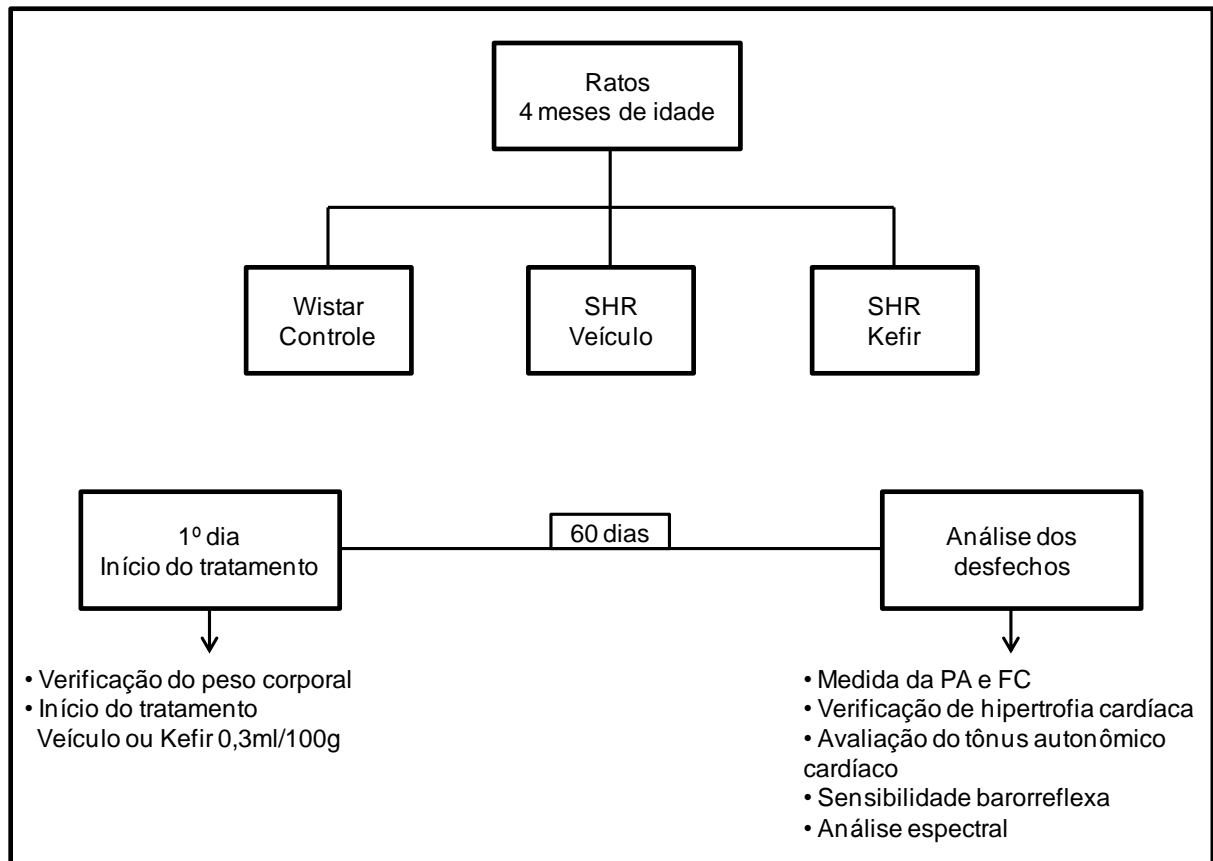


Figura 4. Cronograma de experimentos.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO PARA MEDIDAS HEMODINÂMICAS

Para a realização da medida direta da pressão arterial pulsátil (PAP), média (PAM) e frequência cardíaca (FC), os animais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/kg). Foi realizada a cateterização da artéria e veia femoral para medida da PA e FC e injeção de drogas, respectivamente. A cânula utilizada foi confeccionada com tubos de polietileno PE-10 (*Intramedic Polyethylene Tubing, Clay Adams, Becton, Dickinson and Company, Nova Jérsei, EUA*) com comprimento de 2,5 a 3,5 cm, acoplado a outro tubo de polietileno PE-50 com comprimento de 16 a 20 cm. Antes de iniciar a cateterização, as cânulas foram preenchidas com solução de salina (0,9%) + heparina, e em seguida obstruída em sua

extremidade com maior diâmetro, com um pino metálico. Os animais foram submetidos a uma incisão na face ventral da pata traseira esquerda, onde a artéria e veia femoral foram dissecadas e expostas. A artéria e a veia foram cateterizadas e as porções PE-50 foram transpassadas sob a pele até o dorso, onde as extremidades destas cânulas foram exteriorizadas e fixadas por meio de fios de sutura nas costas do animal.

Esses animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas na sala de experimentos sob condições de temperatura e luminosidade controladas durante 24 horas para recuperação. Os animais foram então conectados por meio do cateter ao equipamento para medidas hemodinâmicas. Após um período de estabilização de 30 minutos foram registradas as ondas de pulso arterial, a partir da qual foi obtida a pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial diastólica (PAD) e a pressão arterial média (PAM), e também as medidas de FC. Os parâmetros hemodinâmicos de PA e FC foram obtidos através da onda de pulso arterial detectada por um transdutor de pressão (TSD 104A, *BIOPAC Systems, Inc.*, Califórnia, EUA) conectado ao sistema de aquisição de dados biológicos (MP 30 *BIOPAC Systems, Inc.*, Califórnia, EUA). Esses dados eram enviados ao computador e processados, como pode ser observado em um dos registros obtidos no presente estudo (figura 5). Este protocolo foi realizado com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento com Kefir sobre os valores pressóricos e de FC dos animais hipertensos.

No final da avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram eutanaziados com uma sobredose de tiopental (100 mg/kg) e os corações foram coletados. O ventrículo direito e o esquerdo, incluindo o septo interventricular, foram dissecados a partir dos tecidos cardíacos e pesados. O osso da tíbia também foi dissecado e teve seu comprimento medido. Para avaliar a extensão de hipertrofia cardíaca para cada animal, o peso do ventrículo esquerdo foi normalizado pelo peso corporal do animal (em mg/g) e comprimento da tíbia (em mm).

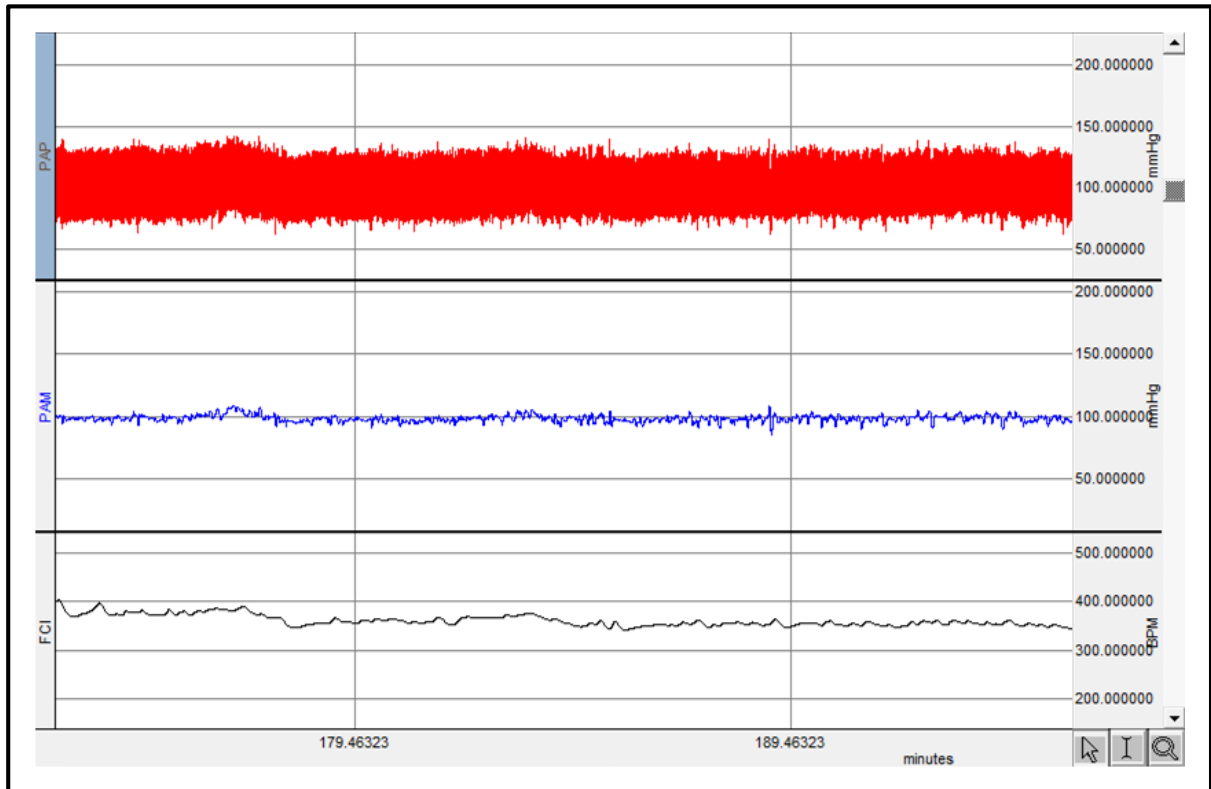


Figura 5. Registro típico da medida da pressão artéria pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um rato wistar acordado.

3.4 AVALIAÇÃO DO TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO

Os tônus autonômicos cardíacos simpático e parassimpático foram estimados através de bloqueadores farmacológicos seletivos dos receptores muscarínicos (N-metil-atropina) e dos receptores β 1-adrenérgicos (atenolol) em animais acordados. Como mostrado no esquema da figura 6 e 10 (superior), o tônus parassimpático cardíaco foi estimado através da variação da FC basal 15 minutos depois de uma única injeção de atropina (2 mg/kg, i.v.), que atinge um efeito de platô, aproximadamente nesse tempo, e tem a duração de aproximadamente 4 horas. Imediatamente depois, foi injetado atenolol (2 mg/kg, i.v.), que também atinge um efeito máximo 15 minutos depois, e este valor foi considerado como a FC intrínseca (marcapasso). No dia seguinte, a sequência das injeções foi invertida e o tônus simpático cardíaco foi estimado através da variação da FC basal 15 minutos após o atenolol e o FC intrínseca cerca de 15 minutos sob o bloqueio duplo.

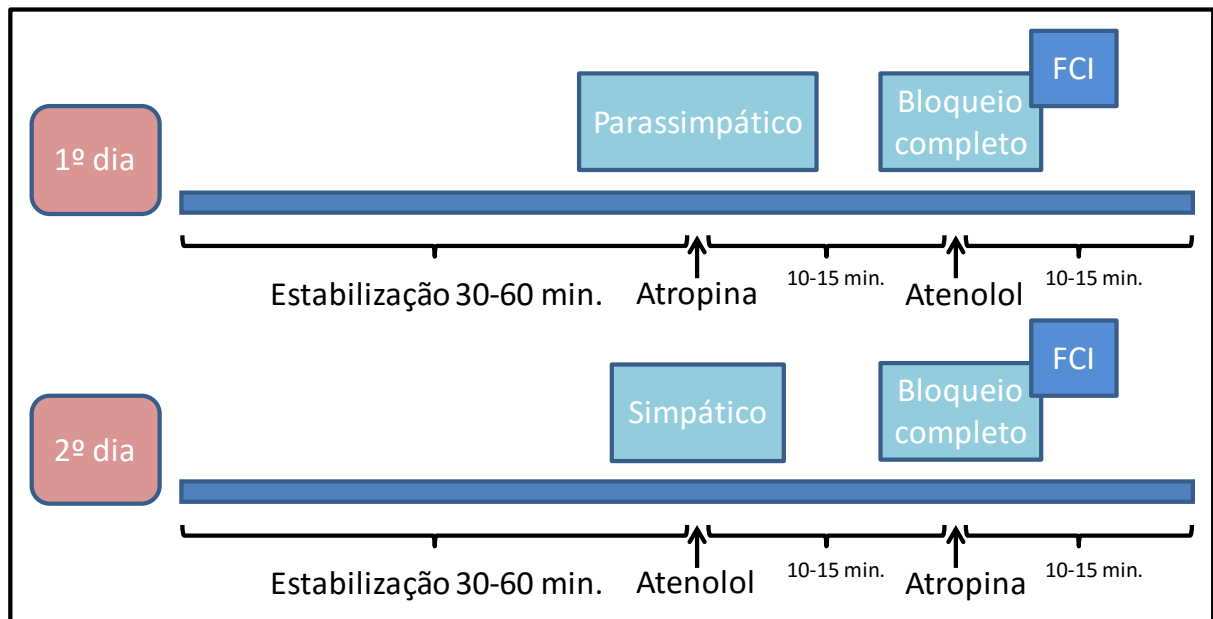


Figura 6. Esquema resumido do protocolo de avaliação do tônus autonômico cardíaco.

3.5 SENSIBILIDADE FARMACOLÓGICA DO BARORREFLEXO

O controle barorreflexo da pressão arterial foi avaliado em animais acordados através da medida da taquicardia e bradicardia reflexa em resposta ao aumento ou diminuição equitativa na PA arterial em cada um dos três grupos de animais. Vinte e quatro horas após a cateterização, os animais foram levados para a sala de experimento e deixados por aproximadamente 1 hora para se ambientarem. O registro foi estabilizado por um período de 30 a 60 minutos. Com os parâmetros cardiovasculares estáveis, iniciou-se o registro definitivo. Em seguida, foi feita a administração por uma única injeção *in bolus* de fenilefrina (5 ug/kg) e nitroprussiato de sódio (40 ug/kg), para induzir um aumento ou uma diminuição da PA em cerca de 25 mmHg, respectivamente, concedendo-se um intervalo de, no mínimo, 10 minutos entre uma dose e outra para que os níveis de PA e FC retornassem a valores próximos aos basais. O aumento ou diminuição da PA em 25 mmHg foi escolhido com base em estudos anteriores do nosso laboratório que demonstram que a maior sensibilidade do barorreflexo se encontra em alterações da PA próximas a valores de repouso, e que as variações na PA superior a 40 mmHg podem desencadear mecanismos humorais complexos. A contribuição relativa do tônus parassimpático e simpático cardíacos foi avaliada por aumento ou diminuição da atividade simpática e parassimpática em resposta a um súbito aumento ou diminuição na pressão arterial, sob o bloqueio de receptores

muscarínicos cardíacos com atropina (2 mg/kg, i.v.) em um dia e o bloqueio dos receptores β 1-adrenérgicos com atenolol (2 mg/kg, i.v.) no dia seguinte (figura 7).

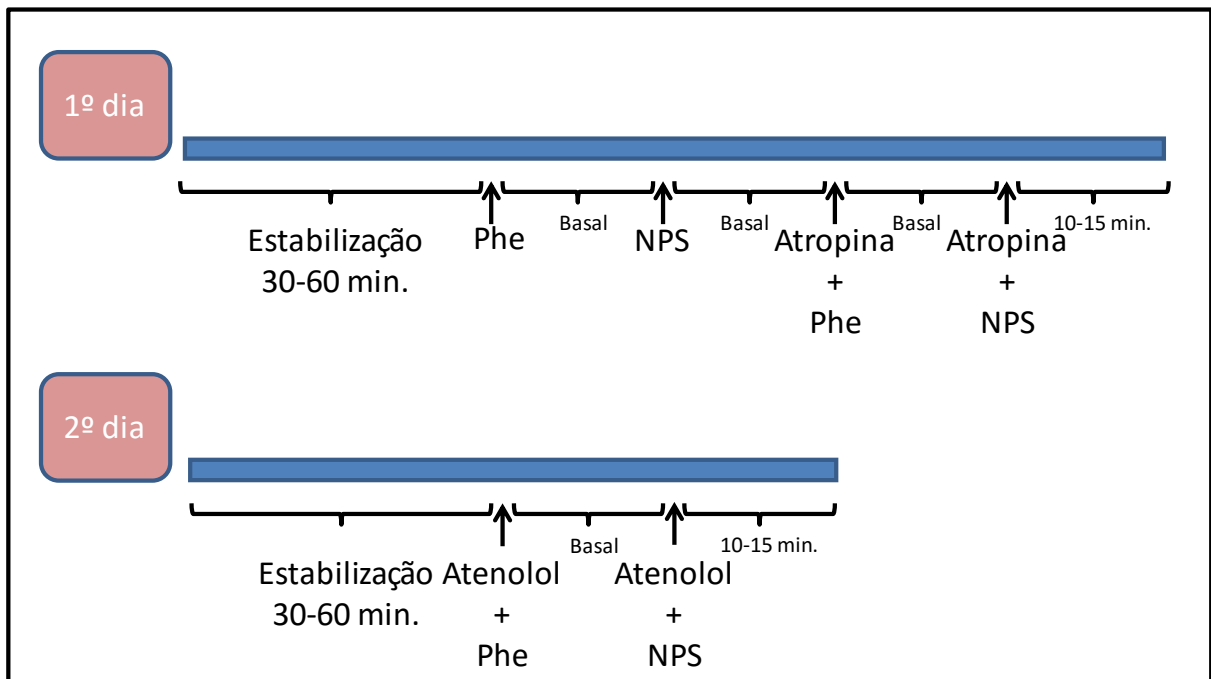


Figura 7. Esquema resumido do protocolo de avaliação da sensibilidade do barorreflexo.

3.6 ANÁLISE ESPECTRAL

Um objetivo deste protocolo foi caracterizar os padrões de controle autonômico em SHR e ratos Wistar normotensos por meio da análise de cada componente espectral (potência) da variabilidade da FC (VFC), expressa em Hertz (Hz) e variabilidade da PA (VPA). Intervalos de pulso da pressão arterial sistólica foram obtidos a partir de 30 minutos de registros contínuos de PA dos animais acordados. Um método paramétrico com base no modelo autorregressivo de análise espectral foi realizado analisando a PAS e intervalo de pulso (IP) (Dantas et al., 2012). Os componentes oscilatórios foram quantificados como muito baixa frequência (VLF: <0,2 Hz), que reflete as ações do sistema renina-angiotensina e outros mecanismos fisiológicos que atuam sobre o tônus cardíaco, de baixa frequência (LF: muitas vezes 0,04-0,5 Hz) correspondente a atividade simpática (e vagal) e alta frequência (HF: 0,6-3,0 Hz) correspondente a atividade vagal influenciada pela respiração. Os espectros de PA e FC também foram expressos em unidades normalizadas (n.u.) obtidos após divisão da potência de um dado componente espectral pela potência total e subtração do componente VLF e multiplicando a razão por 100. A análise espectral também foi utilizada para estimar a sensibilidade do barorreflexo espontâneo através de sequências entre a série

temporal do IP e PAS. A análise dos aumentos ou diminuições espontâneas na PA, em concordância com reduções ou aumentos no IP, nos permitiu quantificar a coerência entre os sinais, ou seja, a relação linear entre a variabilidade do IP e a variabilidade da PAS, e a fase, o desvio entre os dois sinais. A variabilidade da sensibilidade dos barorreceptores (ganho) foi determinada pelo índice α -LF, que foi obtido pela raiz quadrada da divisão entre a potência absoluta de FC-LF/PA-LF, expressa em ms/mmHg.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm EPM. O teste de normalidade D'Agostino-Pearson foi realizado para verificar se os valores se distribuem em uma curva Gaussiana. As comparações estatísticas entre os diferentes grupos foram realizadas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido por teste *post hoc* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism versão 6.07.

4 RESULTADOS

4.1 PA E FC BASAL EM ANIMAIS ACORDADOS

Como esperado, animais SHR exibiram significativamente altos níveis de PA sistólica, diastólica e média (204 ± 8 , 144 ± 4 e 167 ± 4 mmHg, respectivamente, $p < 0,05$) e FC de repouso (355 ± 9 bpm, $p < 0,05$) comparado com os ratos Wistar (140 ± 8 , 88 ± 2 e 104 ± 2 mmHg, respectivamente e 328 ± 12 bpm) (figura 8). A administração de Kefir por 60 dias provocou uma atenuação significativa da PA sistólica, diastólica e média e da FC, que foram reduzidas para 169 ± 8 , 116 ± 6 e 134 ± 6 mmHg, respectivamente, e na FC, foi diminuída para 324 ± 12 bpm ($p < 0,05$).

4.2 HIPERTROFIA CARDÍACA

Como mostrado na Tabela 1, o peso corporal foi significativamente diminuído (aprox. 32%, $p < 0,05$) em ratos SHR tratados e não-tratados quando comparados com animais Wistar de mesma idade (480 ± 8 g, $p < 0,05$). A massa cardíaca ventricular esquerda e direita foi significativamente maior em SHR não tratado (13% e 40%, respectivamente, $p < 0,05$) do que em ratos Wistar normotensos (767 ± 29 e 274 ± 20 mg, respectivamente). A administração de Kefir por 60 dias provocou uma significativa diminuição da massa do ventrículo esquerdo (12%) e uma significativa atenuação da massa do ventrículo direito (8%). A relação entre o peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal, ou comprimento da tíbia, mostrou uma hipertrofia ventricular esquerda no grupo SHR não-tratado ($2,7 \pm 0,3$ mg/g e $22 \pm 1,4$ mg/mm, respectivamente, $p < 0,05$) quando comparado com os valores observados no grupo Wistar ($1,64 \pm 0,4$ mg/g e de $17,1 \pm 1,4$ mg/mm, respectivamente). O tratamento do SHR com Kefir por 60 dias não teve efeito significativo sobre a hipertrofia do ventrículo esquerdo, quando o peso deste foi normalizado pelo peso corporal ($2,4 \pm 0,2$ mg/g, $p < 0,05$), mas verificou-se reduzida quando normalizado pelo comprimento da tíbia ($19 \pm 1,2$ mg/mm, $p < 0,05$) (figura 9).

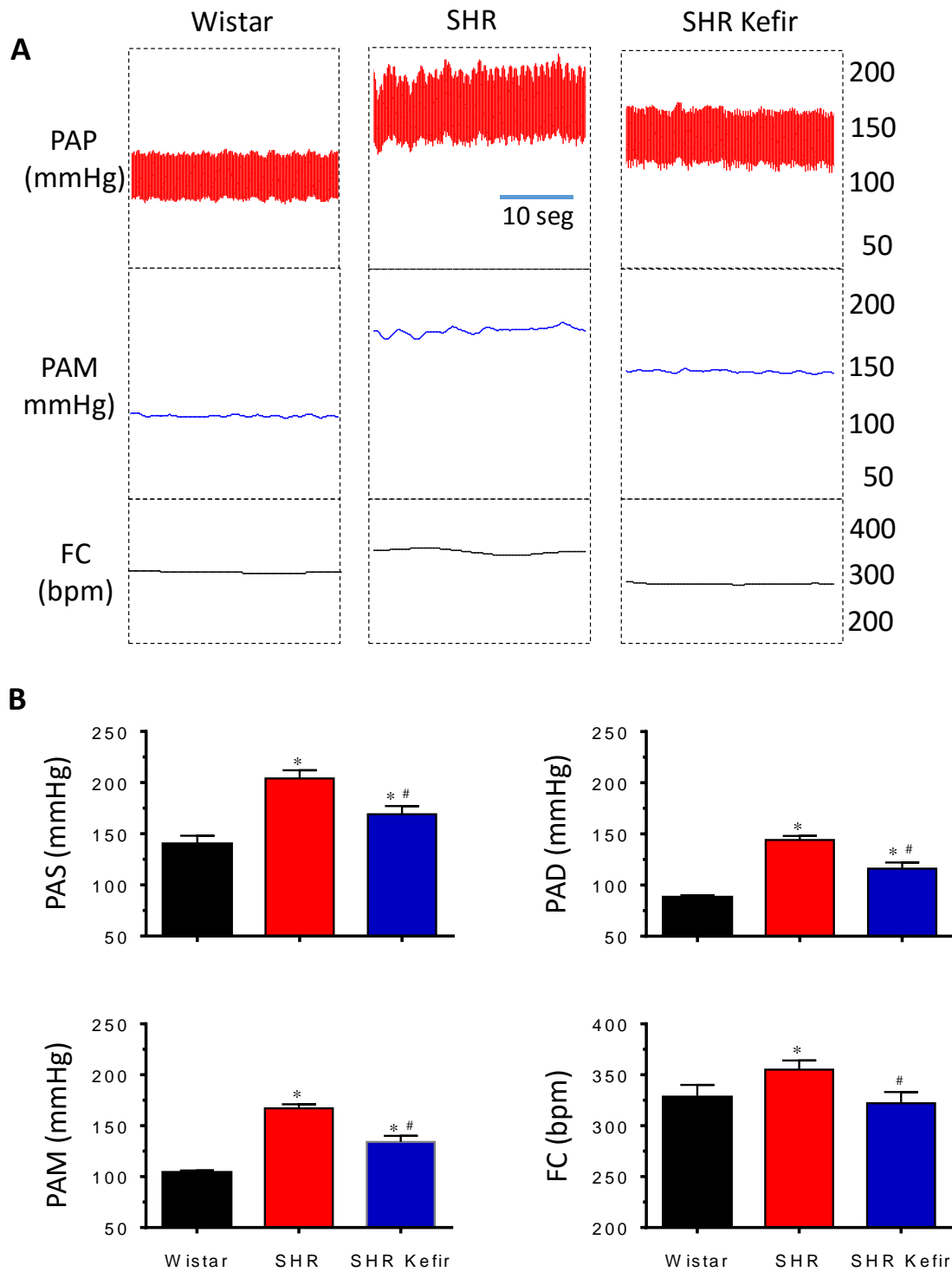


Figura 8. (A) Registros típicos da PAS, PAM e FC e (B) efeito da administração crônica de Kefir na pressão arterial em animais controle, hipertenso e hipertenso tratado. PAS: Pressão Arterial Sistólica, PAD: Pressão Arterial Diastólica, PAM: Pressão Arterial Média e FC: Frequência Cardíaca. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=8 por grupo). *p<0,5 comparado com o grupo Wistar, #p<0,05 comparado com SHR não tratado (ANOVA uma via).

Tabela 1. Peso corporal, peso cardíaco e comprimento da tíbia dos animais Wistar, SHR não-tratado e SHR tratados por 60 dias com Kefir.

Parâmetros	Grupos		
	Wistar (8)	SHR (8)	SHR-kefir (8)
Peso corporal (g)	480±8	328±3*	326±4*
Peso ventrículo esquerdo (mg)	787±29	893±30*	785±25 [#]
Peso ventrículo direito (mg)	274±20	386±24*	352±37*
Comprimento da tíbia (mm)	46±0.3	41±0.3*	41±0.3*

Valores expressos como média±EPM. *p<0.05 vs. grupo Wistar; [#]p<0.05 vs. grupo SHR não-tratado.

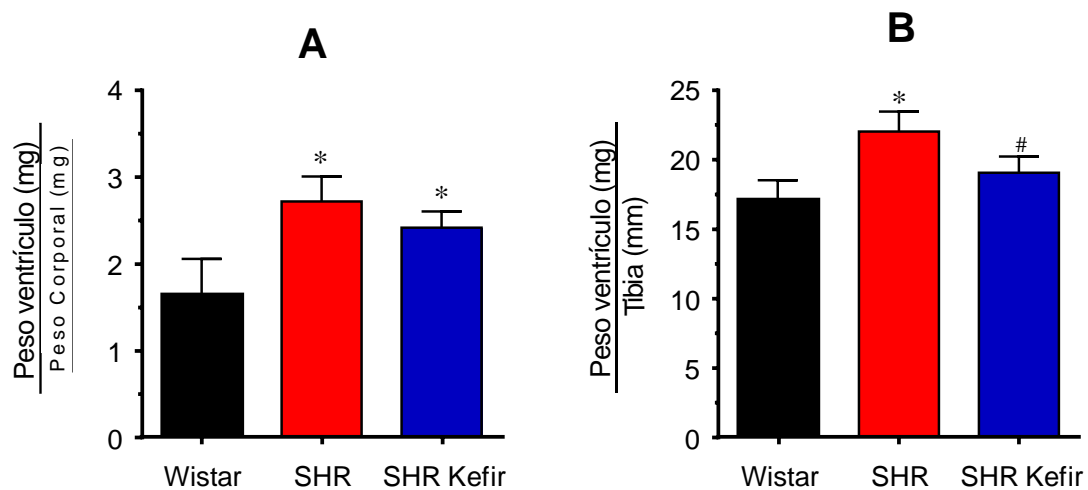


Figura 9. Efeito da administração crônica de Kefir sobre a hipertrofia cardíaca em animais controle, hipertenso e hipertenso tratado, utilizando o peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal (gráfico da esquerda) e comprimento da tíbia (gráfico da direita). Os valores estão expressos como médias±EPM (n=8 por grupo). *p<0,5 comparado com o grupo Wistar, [#]p<0,05 em comparação com SHR não tratado (ANOVA de uma via).

4.3 TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO

O protocolo utilizado para avaliar o tônus parassimpático (vagal) e simpático cardíaco é esquematicamente mostrado na figura 10 (painel superior). No grupo normotenso, o bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina resultou em um significativo aumento na FC basal, de 336±15 para 455±11 bpm, indicando um tônus vagal de +120 bpm. No grupo SHR não tratado, a variação na FC basal foi de 365±12 para 406±17 bpm (aprox. +40 bpm), apresentando então, uma significativa diminuição do tônus vagal comparado com os animais Wistar. O grupo SHR tratado com Kefir por 60 dias, apresentou uma significativa variação de 319±15 para 410±12 rpm, após o

bloqueio muscarínico com atropina, indicando uma recuperação parcial do tônus vagal (aprox. +90 bpm, $p<0,05$) (figura 10, painel inferior).

O bloqueio dos β_1 -adrenoceptores com atenolol, que foi usado para avaliar o tônus simpático cardíaco, causou resultados opostos (figura 10, painel inferior). A FC basal foi reduzida para 306 ± 14 bpm (aprox. -30 bpm) no grupo Wistar. Em animais SHR não tratados a magnitude da redução da FC basal foi significativamente maior (277 ± 16 bpm, aprox. -90 bpm, $p<0,05$), demonstrando aumento do tônus simpático neste grupo. Porém, o tratamento com Kefir por 60 dias reduziu esta variação para 294 ± 15 bpm (aprox. -25 bpm)

A FC intrínseca, que foi considerado como a FC sob o duplo bloqueio com atropina e atenolol, foi semelhante nos três grupos de animais (figura 10, painel inferior).

4.4 ANÁLISE FARMACOLÓGICA CLÁSSICA DA FUNÇÃO DO BARORREFLEXO

O efeito da administração de Kefir na sensibilidade do barorreflexo bem como a contribuição relativa dos componentes vagal e simpático cardíaco em SHR são mostrados nas figuras 11 e 12. Como esperado, quando o barorreflexo foi desafiado por aumentos moderados induzidos por fenilefrina na PA (aprox. 25 mmHg), o grupo SHR mostrou uma significativa diminuição no reflexo de bradicardia (~50%, $p<0,05$), quando comparado com o grupo Wistar e, conseqüentemente, uma significativa redução no ganho do barorreflexo (~50%, $p<0,05$) (figura 11). O tratamento com Kefir por 60 dias resultou em leve, mas significativa, melhora do reflexo de bradicardia (~40%, $p<0,05$) e, conseqüentemente também no ganho do barorreflexo (~35%, $p<0,05$). O bloqueio dos receptores muscarínicos cardíacos com atropina basicamente aboliu o reflexo de bradicardia e o ganho do barorreflexo de maneira semelhante entre os três grupos. O desaparecimento das diferenças entre os grupos no reflexo de bradicardia após bloqueio com atropina indica que há um prejuízo no componente vagal do barorreflexo.

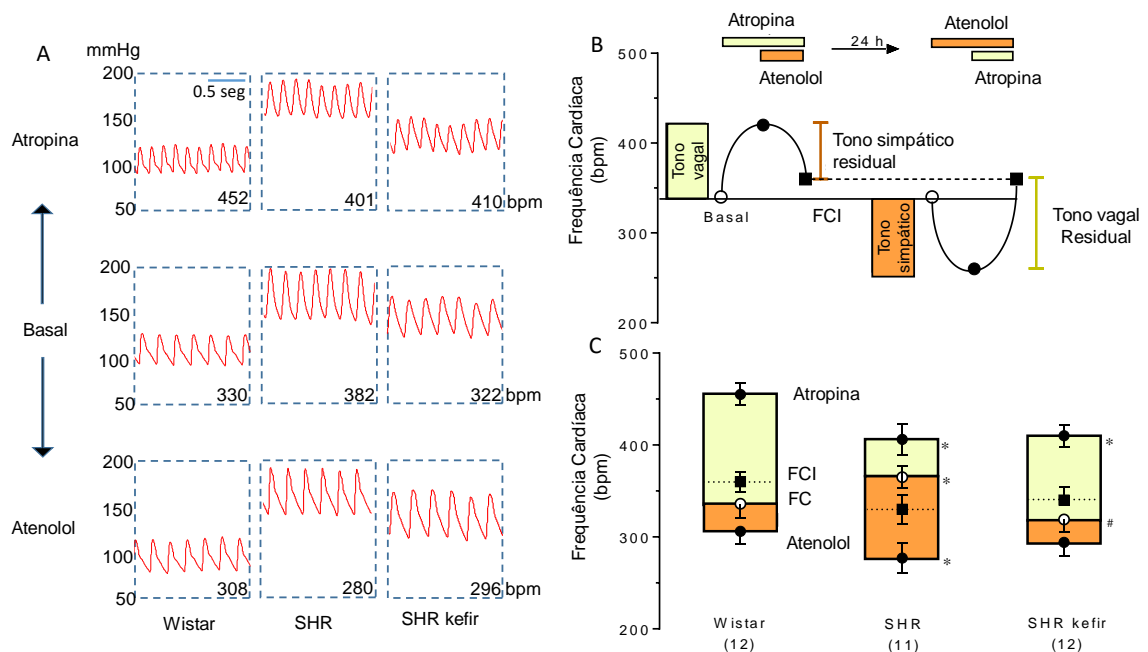


Figura 10. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre o tônus autonômico cardíaco dos animais SHR. Como mostrado no esquema (painel direito), o tônus vagal cardíaco foi determinado pelo bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina, o tônus simpático foi determinado pelo bloqueio dos receptores β_1 -adrenérgicos com atenolol e o marcapasso ou frequência cardíaca intrínseca (FCI) foi determinado pelo duplo bloqueio da atividade vagal e simpática. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=11 a 12 por grupo). *p<0,05 vs. grupo Wistar; #p<0,05 vs. SHR não tratados.

Quando avaliamos o barorreflexo por diminuições moderadas induzida por nitroprussiato de sódio na PA (aprox. 25 mmHg), o grupo SHR mostrou uma significativa diminuição no reflexo de taquicardia (38%, p<0,05), quando comparado com o grupo Wistar e, conseqüentemente, uma redução significativa no ganho do barorreflexo (32%, p<0,05) como observado na figura 12. O tratamento com Kefir por 60 dias, reduziu estas diferenças para ~8% e ~12%, respectivamente, p<0,05. O bloqueio dos receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos com atenolol reduziu a taquicardia reflexa em Wistar, SHR não tratado e SHR-Kefir. Os valores alcançados foram significativamente reduzidos em SHR quando comparados com Wistar e significativamente normalizados em SHR tratados com Kefir por 60 dias (7 \pm 2,8, 14 \pm 2,4 e 12 \pm 2,4 bpm, respectivamente). Efeito semelhante foi observado no ganho do barorreflexo (0,26 \pm 0,10, 0,53 \pm 0,11 e 0,46 \pm 0,12 bpm/mmHg, respectivamente) (figura 12). A menor taquicardia reflexa e ganho do barorreflexo em SHR sob o efeito atenolol indicam que parte da taquicardia reflexa pode ser devido a uma retirada da atividade vagal, que foi reduzido no SHR.

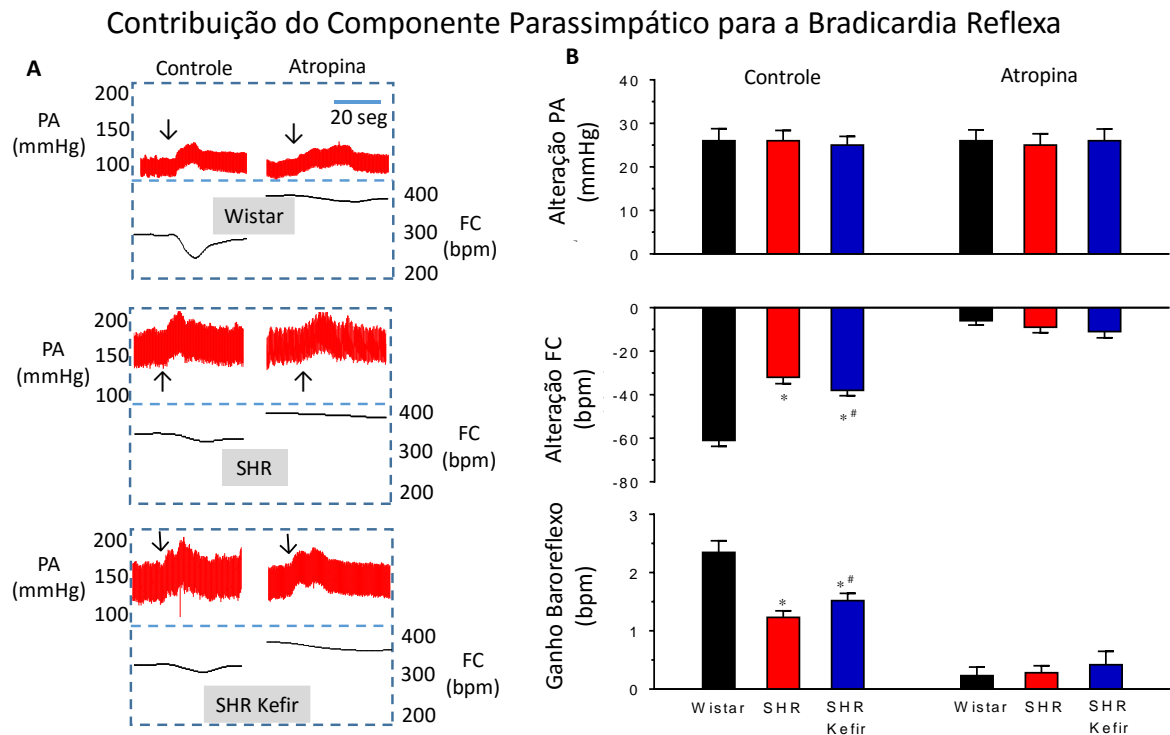


Figura 11. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre o reflexo de bradicardia em SHR comparado com SHR não tratados e ratos Wistar normotensos. Nos três grupos de animais acordados, a fenilefrina induziu aumentos semelhantes (~ 25 mmHg) na pressão arterial. Os experimentos foram realizados antes e após o bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina. Os valores estão expressos como médias \pm EPM ($n=10$ a 12 por grupo). * $p<0,05$ vs. grupo Wistar; # $p<0,05$ vs. SHR não tratado.

4.5 ANÁLISE ESPECTRAL

A análise espectral foi aplicada para estudar o efeito do Kefir sobre a variabilidade da FC e da PA em ratos SHR comparado com SHR não tratados e ratos Wistar normotensos. A tabela 2 mostra uma significativa elevação na variação da FC em SHR não tratado (730 ± 150 ms², $p<0,05$) quando comparado com SHR tratados com Kefir (478 ± 80 ms²) e com ratos Wistar normotensos (247 ± 46 ms²). A análise espectral da potência de cada componente da variabilidade da FC (Tabela 2) mostrou uma diferença notável em que o componente FC-LF, que é amplamente aceito como um índice de modulação simpático foi significativamente aumentado em duas vezes (82 ± 10 ms², $p<0,01$) quando comparado com o grupo de Wistar (39 ± 9 ms²), sugerindo uma alta atividade simpática no grupo SHR.

Contribuição do Componente Simpático para a Taquicardia Reflexa

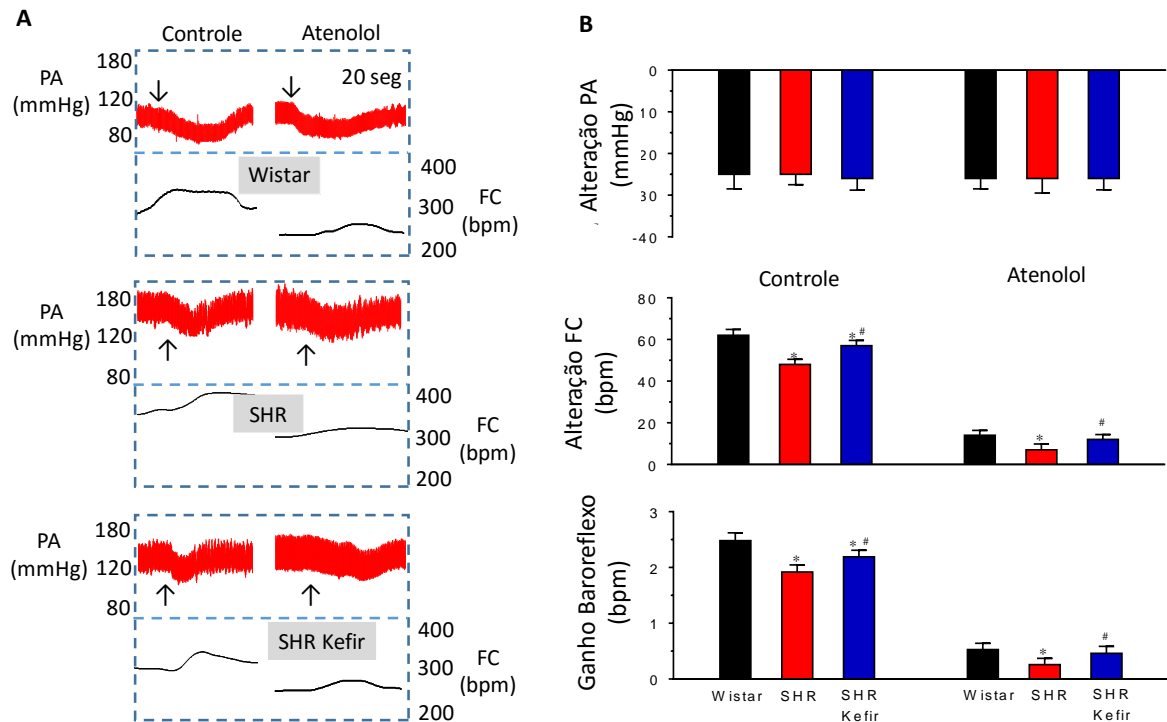


Figura 12. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre o reflexo de taquicardia em SHR comparado com SHR não tratados e ratos Wistar normotensos. Nos três grupos de animais acordados, o nitroprussiato de sódio induziu semelhante diminuição (~25 mmHg) na PA. Os experimentos foram realizados antes e após o bloqueio dos receptores β_1 -adrenérgico com atenolol. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=10 a 12 por grupo). *p<0,05 vs. grupo Wistar; #p<0,05 vs. SHR não tratado.

O tratamento do SHR com Kefir por 60 dias provocou uma significativa atenuação do componente FC-LF (1,4x, 56 ± 10 ms², p<0,05) (Figura 13, gráfico de barras da esquerda). No entanto, quando a comparação foi feita utilizando os valores normalizados de FC-LF, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos experimentais no controle simpático do coração. A comparação dos valores de FC-HF, que é amplamente associada com modulação vagal, não mostrou diferenças significativas entre os valores de variância de HF e entre os valores normalizados (Tabela 2 e Figura 13, gráfico de barras da esquerda). Portanto, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos experimentais no controle vagal da função cardíaca.

A análise espectral da variabilidade da PA mostrou um significativo aumento na variância em SHR não tratado (73 ± 9 mmHg², p<0,05) quando comparados com os ratos Wistar (22 ± 3 mmHg²) e foi reduzido significativamente, mas não normalizado, no grupo SHR tratados com Kefir (65 ± 8 mmHg²). O valor de PA-LF, que está ligado

Tabela 2. Efeito do tratamento crônico com Kefir sobre a variabilidade da FC e PA em SHR.

Variabilidade dos parâmetros	Grupos		
	Wistar (10)	SHR (12)	SHR Kefir (10)
Frequência Cardíaca			
Variância (ms ²)	247±46	730±150*	478±80
Muita Baixa Frequência (ms ²)	123±56	334±66*	204±27 [#]
Baixa Frequência (ms ²)	39±9	82±10*	56±10 [#]
Alta Frequência (ms ²)	59±18	97±20	86±20
Baixa Frequência/Alta Frequência	0.69±0.17	0.91±0.18	0.78±0.19
Baixa Frequência (nu)	50±5	43±5	45±6
Alta Frequência (nu)	60±5	46±6	59±5
Pressão Arterial			
Variância (mmHg ²)	22±3	73±98*	65±8*
Muita Baixa Frequência (mmHg ²)	11±1	44±5*	40±4*
Baixa Frequência (mmHg ²)	3.7±0.4	13±2*	8±2 ^{**}
Baixa Frequência (%)	57±3	76±1%*	53±4 [#]

Os valores estão expressos como médias±EPM. *p<0,05 vs. grupo Wistar; [#]p<0,05 vs. grupo SHR não tratado.

ao tônus vasossimpático, foi maior no grupo SHR não tratado (13±2 mmHg², p<0,05) quando comparado com os ratos Wistar normotensos (3,7±0,4 mmHg²) (tabela 2 e Figura 13, gráfico de barras do meio), fornecendo uma evidência de uma relação entre a alta PA, alta atividade vascular simpática e poder espectral PA-LF no SHR. O tratamento com Kefir no SHR por 60 dias reduziu significativamente o valor para 8±2 mmHg² (figura 13, gráfico de barras do meio). Resultados semelhantes foram observados quando a análise de PA-LF foi feita com valores normalizados (%) (tabela 2).

A análise da sensibilidade do baroreflexo espontâneo através do α -índice LF nas condições de uma coerência superior a 0,5 e uma fase negativa, os SHR não tratados

exibiram valores de sensibilidade significativamente mais baixos do que o grupo Wistar (1.36 ± 0.09 vs. 1.75 ± 0.11 ms²/mmHg, $p < 0,05$). O tratamento com Kefir em SHR por 60 dias provocou uma tendência (1.48 ± 0.09 ms/mmHg, $p < 0,05$) para a atenuação dessa disfunção (Figura 13, gráfico de barras da direita).

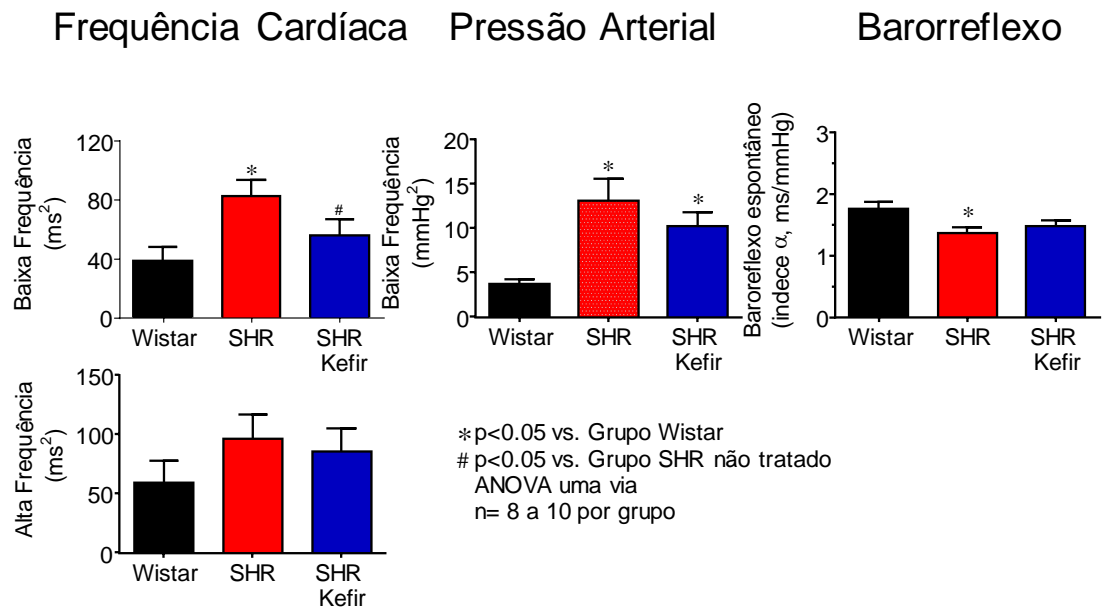


Figura 13. Efeitos da administração crônica de Kefir sobre a análise espectral da frequência cardíaca e pressão arterial em SHR comparado com SHR não tratado e ratos Wistar normotensos. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n=10 a 12 por grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo Wistar; # $p < 0,05$ vs. SHR não tratado.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos dos grãos de Kefir no controle autonômico cardiovascular e sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR, já que a maioria dos estudos disponíveis têm-se centrado em bactérias isoladas fornecendo informações limitadas sobre o papel funcional da bebida amplamente consumida obtida por fermentação de leite com grãos de kefir.

Como esperado, os animais SHR apresentaram uma PA elevada em relação ao grupo Wistar, e o Kefir reduziu a PA significativamente. Nosso trabalho mostrou que o tratamento com o Kefir por 60 dias foi capaz de diminuir a hipertrofia cardíaca quando normalizada pelo comprimento da tibia, além de aumentar o tônus parassimpático e diminuir o simpático, que está diminuído e aumentado no SHR, respectivamente. O Kefir também foi capaz de melhorar o ganho do barorreflexo aumentando a taquicardia e a bradicardia reflexa e também uma mostrou uma melhora na variabilidade da FC e PA e uma tendência no barorreflexo espontâneo.

Diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos benéficos do Kefir em diminuir a pressão sanguínea (Gómez-Guzmán et al., 2015), a glicemia (Ostadrahimi et al., 2015) e lesão causada por isquemia-reperusão (Yener et al., 2015), sugerindo que esta bebida de leite fermentado pode ser útil em diferentes eventos cardiovasculares. Estes efeitos benéficos foram explicados pela presença de bactérias e fungos nos grãos de Kefir, por haver nele uma relação simbiótica próxima (Lu et al., 2014); resultando na produção de elementos bioativos (Hamet et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Existem vários estudos demonstrando que o consumo de produtos lácteos fermentados com compostos bioativos atenua a pressão arterial elevada, como observado em 2009, por Jakala e colaboradores, que após o tratamento de animais SHR com tripeptídeos obtidos pela fermentação do leite pelo *Lactobacillus helveticus* durante 8 semanas, obteve-se uma redução dos níveis pressóricos, assim como observado por outros autores (Rodríguez-Figueroa et al., 2013; Rodríguez-Figueroa et al., 2012; Gómez-Guzmán et al., 2015), e Ostadrahimi e colegas, 2015, observaram redução nos níveis glicêmicos de jejum de pacientes com diabetes do tipo 2. Mas até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos do Kefir sob o barorreflexo e o tônus autonômico cardíaco em modelo experimental de hipertensão arterial.

O objetivo principal do nosso estudo foi investigar os efeitos do Kefir sobre a disfunção autonômica cardíaca e barorreflexa em SHR tratados por 60 dias. O SHR é um modelo amplamente conhecido por apresentar hipertensão arterial primária, hipertrofia cardíaca, disfunção arterial e controle nervoso autonômico anormal (Monteiro et al., 2012; Friques et al, 2015; Barbosa Neto et al., 2012; Ceroni et al., 2008). Usando uma abordagem clássica para avaliar os tônus autonômicos cardíacos e a sensibilidade farmacológica do barorreflexo, observou-se um aumento do tônus simpático e uma diminuição da sensibilidade do barorreflexo no grupo SHR.

O estudo avaliou os efeitos do Kefir sobre a modulação autonômica cardíaca em SHR após 60 dias de tratamento com base no estudo anterior, feito pelo nosso laboratório, mostrando que a administração por períodos mais curtos não tem efeitos significativos na FC, PA e função endotelial (Friques et al., 2015). De acordo com este estudo, a administração crônica de Kefir por 60 dias atenuou a PA alta, aboliu a taquicardia e atenuou a hipertrofia cardíaca em SHR.

Como demonstrado anteriormente através de análise microbiológica e microscopia eletrônica de varredura, os grãos de Kefir brasileiros que usamos no presente estudo são uma mistura complexa de bactérias específicas e leveduras que tem uma relação simbiótica e harmoniosa, incluindo os *Lactobacillus kefirianofaciens*, *Lactobacillus kefir* e *Candida kefir* (Friques et al., 2015). Foi demonstrado que o consumo crônico de Kefir tem efeito protetor contra o desenvolvimento de alta PA, disfunção endotelial e danos na superfície endotelial no modelo SHR da hipertensão essencial, SHR (Friques et al., 2015).

5.1 PA E FC BASAL EM ANIMAIS ACORDADOS

A PA de ratos normotensos apresenta pequenas variações entre a terceira e quarta semanas após o seu nascimento (Gray, 1984). Em SHR, o aumento da PA pode ocorrer entre a terceira e décima semana de vida, um aumento de até 30% acima da PA de ratos Wistar Kyoto (Clubb et al., 1987). Já a frequência cardíaca do SHR está aumentada nas primeiras semanas de vida quando comparada com a dos ratos Wistar Kyoto (Dickhout & Lee, 1998).

Conforme esperado e demonstrado na literatura, animais SHR apresentaram elevados níveis de pressão arterial média ≈ 175 mmHg (Javkhedkar & Banday, 2015;

Fernandes et al., 2015; Ribeiro et al., 2014) em comparação com os ratos Wistar, que apresentavam valores de 100 mmHg. A administração de Kefir por 60 dias, provocou uma queda significativa neste parâmetro, ou seja, o tratamento com Kefir foi capaz de reduzir a PA dos animais hipertensos para 130 mmHg.

Nossos resultados mostraram que os ratos SHR exibiram níveis maiores na PAS, PAD, PAM e FC quando comparados com ratos Wistar, corroborando com os dados de autores já citados acima. O tratamento por 60 dias com o Kefir atenuou a PA sistólica, diastólica, média e a FC de repouso, que corrobora com o resultado de outros autores que demonstraram que o tratamento crônico por 5 semanas induz significativamente variações na microbiota para restaurar a disbiose intestinal e diminuir a pressão sanguínea em ratos SHR (Gómez-Guzmán et al., 2015). O tratamento com Kefir por 60 dias, também foi capaz de diminuir a lesão renal induzida pela isquemia-reperfusão em ratos Sprague-Dawley, com consequente redução dos níveis de uréia, creatinina e TNF-alfa plasmáticos. Esses resultados têm sido associados à redução do estresse oxidativo tecidual, e aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase (Yener et al., 2015). Com base nos vários efeitos benéficos, esta bebida de leite fermentado pode ser útil na prática médica de diversas condições cardiovasculares. Estes efeitos benéficos podem ser explicados pela presença de bactérias e leveduras que partilham uma relação simbiótica nos grãos de Kefir (Lu M et al., 2014) e resultam na produção de elementos biogênicos (Hamet et al., 2013).

5.2 HIPERTROFIA CARDÍACA

A hipertrofia ventricular esquerda é um processo adaptativo reconhecido do miocárdio para aumentar a geração de pressão sistólica e reduzir o estresse pressórico sobre as paredes da câmara ventricular (Bing et al., 1995). A alteração na massa e na geometria da câmara permite que o ventrículo se adapte ao aumento de trabalho cardíaco mantendo a sua fração de ejeção. Se o estímulo for persistente, surgirão alterações na função miocárdica que levam a insuficiência cardíaca (Cicogna et al., 1997). O remodelamento cardíaco, assim como o vascular, é uma alteração presente na hipertensão que pode estar relacionada a diferentes mecanismos fisiopatogênicos que se sobrepõem com o avanço da doença. Um deles é o aumento de angiotensina II (Laragh, 1992). A hipertrofia ventricular esquerda observada em animais SHR,

evidenciada pela relação peso ventricular esquerdo/peso corporal está aumentada em 20 semanas e associada com o aumento da expressão do gene ECA (Schunkert et al., 1990) sugerindo a participação do sistema renina-angiotensina no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

No presente estudo, observamos alterações como um aumento da massa do ventrículo esquerdo em ratos SHR, indicando a presença de uma hipertrofia ventricular esquerda, achado esse que corrobora com dados de outros autores que observaram uma hipertrofia ventricular esquerda marcante, dependendo da fase da hipertensão em ratos SHR (Doggrell & Brown, 1998). A administração de Kefir por 60 dias provocou uma significativa diminuição da massa do ventrículo esquerdo e uma significativa atenuação do ventrículo direito, mostrando um efeito significativo sobre a hipertrofia do ventrículo esquerdo quando normalizado pelo comprimento da tíbia. Quando normalizado pelo peso dos ratos observamos uma tendência na diminuição da massa do ventrículo esquerdo.

5.3 TÔNUS AUTONÔMICO CARDÍACO

O sistema nervoso simpático tem uma ação excitatória no coração e nos vasos sanguíneos, enquanto que a inervação parassimpática cardiovagal tem uma ação inibidora sobre o coração. Assim, a atividade equilibrada eferente do sistema nervoso autonômico e barorreceptores arteriais é essencial para o controle do sistema cardiovascular para atingir o fluxo de sangue ideal para os órgãos do corpo. Anormalidades no controle autonômico de funções cardiovasculares e variabilidade da frequência cardíaca contribuem para morbidade e mortalidade cardiovascular. (Campagnaro et al., 2012).

Estudos feitos em nosso laboratório mostraram que as condições de atividade exagerada e sustentada do simpático, a atividade parassimpática reduzida, e disfunção do barorreflexo são riscos cardiovasculares importantes e estas condições patológicas estão presentes como um resultado da hipertensão induzida pela ativação do sistema renina-angiotensina (RAS) em ratos e camundongos com hipertensão renovascular (Cabral et al., 1988; Moyses et al., 1994b; Peotta et al., 2007; Gava et al., 2008).

O modelo experimental de hipertensão arterial SHR, classicamente, apresentam alterações hemodinâmicas cardíacas associadas com o prejuízo do tônus cardíaco, redução da sensibilidade do barorreflexo e alterações na modulação autonômica da variabilidade da frequência cardíaca. Eles são caracterizados principalmente por uma redução da influência do componente vagal e pelo aumento da influência do componente simpático (Okamoto & Aoki, 1963; Blanco et al., 2015; Shimojo et al., 2015).

Na população em geral, a atividade autonômica mostra um ritmo circadiano com a prevalência do tônus simpático durante o dia e nas primeiras horas ao acordar e um aumento relativo do tônus simpático durante a noite (Bernardi et al., 1992). A disfunção autonômica cardíaca ocorre em diversas doenças que diretamente ou indiretamente afetam o coração aumentando o risco e o grau de morbidade e mortalidade. É definida como um desequilíbrio entre a atividade simpática e vagal associada com disfunção do barorreflexo e aumento da variabilidade da pressão arterial (Blanco et al., 2015; Masson et al., 2015). Normalmente, a atividade do tônus simpátovagal estão em equilíbrio dinâmico. No entanto suas atividades podem ser rapidamente moduladas em respostas a mudanças exigidas pelo ambiente. Empiricamente, existe grande conjunto de evidências para sugerir que o desequilíbrio autonômico está associado à várias condições patológicas, como aumento da variabilidade da PA e dano em órgãos alvos e aumento do risco de arritmias e morte súbita cardíaca. Assim, o desequilíbrio autonômico pode ser uma via final comum para o aumento da morbidade e mortalidade por uma série de condições e doenças, incluindo idade, aterosclerose, hipertensão, infarto do miocárdio, falência cardíaca e diabetes (Thayer et al., 2010; Abboud, 2010).

Na insuficiência cardíaca congestiva crônica, há alterações do eixo neuroendócrino que contribuem para a descompensação hemodinâmica, a perpetuação de sintomas e, aparentemente, a progressão do estado da doença. Um componente importante deste distúrbio neuroendócrino é o perfil autonômico marcadamente anormal de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, o qual tem sido descrito como tendo um aumento do tônus simpático. Assim, a falha ventricular que acompanha esse desarranjo autonômico é constituído predominantemente pelo tônus simpático aumentado ou de uma combinação do tônus simpático aumentado com retirada do parassimpático (Binkley et al., 1991). Os pacientes que têm diabetes podem

apresentar alto risco de desenvolver disfunção autonômica, e a disfunção autonômica já pode estar presente em pacientes com diabetes diagnosticada recentemente. Os parâmetros glicêmicos estão associados com todas as causas de morte em doentes com diabetes, tolerância à glicose diminuída, e até mesmo a tolerância à glicose normal (Gerritsen et al., 2001).

Considerando que o sistema nervoso autônomo influencia significativamente a FC e a PA, e que seu desbalanço tem sido associado com dano de órgão-alvo e aumento do risco de morbidade e mortalidade (Abboud, 2010; Abboud et al., 2012), nós avaliamos os efeitos de Kefir no tônus cardíaco parassimpático (vagal) e tônus cardíaco e vascular simpático em SHR, por meio de um protocolo experimental clássico. O tônus cardiovagal parassimpático e o tônus cardio-vaso-simpático foram avaliados através do método invasivo clássico ilustrado na figura 10. O aumento da FC após administração de atropina, um bloqueador do receptor colinérgico muscarínico, reflete o tônus cardiovagal presente sob condições de repouso, e a diminuição da FC após a administração de atenolol, um bloqueador β 1-cardíaco, reflete o tônus simpático cardíaco; um duplo bloqueio permite a determinação da FC intrínseca. Nossos dados mostraram que a atividade simpática estava aumentada e a atividade vagal diminuída nos ratos SHR quando comparado com o Wistar, mostrando um desbalanço simpato-vagal, que está de acordo com outros autores (Shimojo et al., 2015; Barbosa Neto et al., 2013). O tratamento por 60 dias com o Kefir foi capaz de atenuar o tônus simpático e aumentar o tônus vagal. O presente estudo foi o primeiro a relatar que a administração crônica de Kefir diminui o tônus simpático e aumenta o tônus vagal, causando uma atenuação significativa no desbalanço autonômico cardíaco em uma magnitude semelhante ao que foi obtido por meio de exercício físico (Barbosa Neto et al., 2013), fototerapia (Monteiro et al., 2012) e medicação farmacológica (Dias da Silva Valdo et al., 2002).

5.4 ANÁLISE FARMACOLÓGICA CLÁSSICA DA FUNÇÃO DO BARORREFLEXO

Entre os sistemas neurais que controlam a função cardiovascular, o barorreflexo é um mecanismo neural conhecido por ter um papel importante na regulação da função cardiovascular, diminuindo as flutuações agudas na pressão arterial através de variações na frequência cardíaca e na resistência vascular. É bem conhecido que a elevação da pressão arterial persistente altera a sensibilidade dos barorreceptores,

contribuindo para o aumento da variabilidade da PA, e induz danos em órgãos. (Peotta V A. et al., 2007; Moreira, 2013). Vários estudos têm sugerido que a diminuição da atividade do barorreflexo é um forte preditor para várias doenças e mortalidade cardíaca (La Rovere et al., 2013).

A cada sístole arterial, terminações nervosas mecanossensitivas localizadas nos seios carotídeos e no arco aórtico geram potenciais de ação que são transmitidos ao NTS na medula dorsal. Lá, os sinais são integrados e resultam na manutenção e no balanço da saída do parassimpático do coração e da saída do simpático para o coração, vasos e rins (Campagnaro et al., 2012). A inervação simpática do coração e dos vasos sanguíneos são excitatórias, provoca vasoconstrição e aumento da frequência e contração cardíaca. Por outro lado, a inervação vagal parassimpática é inibitória e diminui a frequência e contração cardíaca. Aumentos na atividade simpática são necessários durante a resposta de fuga ou luta, enquanto que aumentos na atividade parassimpática são necessárias para acalmar o coração durante aumentos impulsionados emocionalmente na pressão arterial (Abboud, 2010).

Entre as consequências cardiovasculares e autonômicas bem conhecidas da hipertensão arterial, podemos destacar a hipertrofia ventricular esquerda, hipertrofia vascular, disfunção cardíaca e hiperatividade simpática (Adams et al., 1989; Ashizawa., 1989). Como sabemos, diversos fatores e sistemas contribuem para estas alterações, no entanto o componente neurogênico merece atenção especial por ser um regulador primário da PA. O barorreflexo é o principal mecanismo neural de ajustes rápidos da pressão arterial, e pode estar alterado diante de algumas fisiopatologias como, por exemplo, a hipertensão arterial e a aterosclerose (Moysés et al., 1994b; Peotta et al., 2001; Vasquez et al., 2012).

A sensibilidade dos barorreceptores é uma excelente medida de função autonômica. Este reflexo pode ser ativado pelo estímulo mecânico dos seios carotídeos, manobra de Valsalva, mudanças posturais e injeções de drogas, os quais induzem modificações de pressão arterial que devem ocasionar modificações na frequência cardíaca (De Angelis et al., 2004). No nosso laboratório, a sensibilidade do barorreflexo tem sido avaliada tradicionalmente através de abordagens farmacológicas em animais acordados. Um aumento agudo da PA induzido por fenilefrina, leva a um aumento no número de potenciais de ação gerado em cada

descarga e, conseqüentemente, um aumento e uma diminuição reflexiva na atividade parassimpática e simpática, respectivamente. O oposto é observado durante uma diminuição aguda da PA induzida por nitroprussiato de sódio. Os picos de PAM e FC em resposta as injeções com fenilefrina e nitroprussiato de sódio são ajustados através de uma análise de regressão linear, e é usado para determinar o ganho, a taquicardia reflexa e a bradicardia reflexa.

A disfunção dos barorreceptores na hipertensão renovascular e em ratos espontaneamente hipertensos é principalmente devido à um déficit vagal. No entanto, com o aumento da hipertensão, o componente simpático do barorreflexo também é prejudicado. Há também uma relação entre a hipertrofia cardiovascular e função do barorreflexo, e têm mostrado que a hipertrofia cardíaca pode contribuir para o déficit da frequência cardíaca vagal (Vasquez et al., 1997). Além disso, o nosso laboratório tem também demonstrado em ratos que o controle barorreflexo da frequência cardíaca pode ser exarcebado em vez de atenuado em determinadas condições patológicas, como a hipertensão induzida por inibição da síntese de óxido nítrico utilizando L-NAME por 6 dias (Vasquez et al., 1994). Variações na sensibilidade do barorreflexo também podem ocorrer em condições não hipertensivas, onde pode haver uma melhora na sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca no infarto crônico do miocárdio, que é acompanhado por hipotensão arterial e bradicardia (Meyrelles et al., 1996). Entretanto, a manutenção da PA em níveis adequados não depende de um único sistema, mas em uma série de interações entre os mecanismos de detecção, tais como barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares, capazes de reconhecer alterações nos parâmetros relacionados à função cardiovascular.

Tem sido visto que um desequilíbrio no balanço entre tônus vagal e simpático podem conduzir a um prejuízo na sensibilidade dos barorreceptores, como tem sido demonstrado em vários modelos de hipertensão arterial (Campagnaro et al., 2012, Moysés et al., 1994a), incluindo o SHR (Monteiro et al, 2012; Dias da Silva Valdo et al., 2002). Portanto, o efeito do Kefir no prejuízo do barorreflexo, que caracteriza o SHR, foi testado por meio de experimentos usando as manobras farmacológicas clássicas invasivas, pelo qual obteve-se bradicardia reflexa durante aumentos induzidos por fenilefrina na PA, e taquicardia reflexa durante diminuições induzidas por nitroprussiato de sódio na PA (Campagnaro et al., 2012; Moysés et al., 1994a).

O presente estudo, portanto, é o primeiro a demonstrar que o tratamento com Kefir por 60 dias melhora o prejuízo da sensibilidade do barorreflexo observado em animais SHR. Quando o procedimento foi repetido sob a ação do bloqueio de atropina, o reflexo de bradicardia e a sensibilidade barorreflexa foi abolida em todos os grupos experimentais, indicando que o prejuízo da função barorreflexa durante aumentos da PA era unicamente devido ao componente vagal. Por outro lado, quando a PA foi reduzida pelo nitroprussiato de sódio em presença do atenolol, o reflexo de taquicardia foi marcadamente reduzido em animais SHR, e em uma menor proporção no grupo Wistar controle e SHR tratados com Kefir. Portanto, nossos dados demonstram que a taquicardia reflexa é consequência tanto da ativação do componente simpático cardíaco com simultânea retirada da atividade parassimpática, corroborando com resultados de outros autores (Campagnaro et al., 2012; Moysés et al., 1994a). Portanto, a taquicardia em resposta à queda da PA observada, pode ser em parte devido a uma concomitante retirada da atividade vagal, mais evidente no grupo Wistar do que no SHR, porque o tônus vagal está prejudicado e, consequentemente, menos eficaz. Nossos dados mostram que o tratamento com o kefir em SHR, restaura parte da atividade autonômica cardíaca e foi capaz de atenuar o prejuízo na sensibilidade do barorreflexo. Portanto, em adição a outras terapias não farmacológicas, tais como o exercício físico (Ceroni et al., 2009), a administração crônica do probiótico nutricional Kefir parece ter ações benéficas por meio da restauração do balanço entre a atividade vagal e simpática e melhora da função do barorreflexo em indivíduos hipertensos.

5.5 ANÁLISE ESPECTRAL

A análise da pressão arterial e da variabilidade da frequência cardíaca por métodos espectrais provou ser uma ferramenta útil para os seres humanos e animais acordados para a investigação da regulação cardiovascular integrativa, para a avaliação do balanço simpático, e para fins de diagnóstico e prognóstico, em doença cardiovascular (Just et al., 2000).

A análise do domínio do tempo e frequência da variabilidade da pressão arterial e da variabilidade da frequência cardíaca foram obtidos a partir de um período de gravação de 30 min. As análises de VPA foram feitas pela série de pressão arterial sistólica e as análises de VFC pela série de intervalos R-R. Os registros foram inspecionados e artefatos e batimentos ectópicos foram manualmente removidos. As análises no

domínio do tempo incluíram a variância da pressão sistólica e dos intervalos R-R. Nas análises no domínio da frequência, as séries temporais de intervalos R-R e de pressão sistólica foram divididas em 34 segmentos contínuos de 300 batimentos com sobreposição de 50%. Após calcular a média dos valores e a variância de cada segmento, foi realizada análise espectral pelo método autorregressivo com ordem de modelo fixa em 16. A densidade espectral de potência é decomposta em componentes fundamentais (raízes complexo-conjugadas do sistema linear), que constituem os componentes oscilatórios, classificados da seguinte forma: frequência muito baixa (VLF, 0.01–0.20 Hz, do inglês *very low frequency*), refletindo as ações do sistema renina-angiotensina e outro mecanismo fisiológico que atua sobre o tônus cardíaco, baixa frequência (LF, 0.20–0.75 Hz, do inglês *low frequency*), correspondente a atividade simpática (e vagal), e alta frequência (HF, 0.75–2.50 Hz, do inglês *high frequency*) correspondente a atividade vagal influenciada pela respiração (Dantas et al., 2013).

A influência do sistema nervoso autônomo na PA e FC são frequentemente dependentes de ambos, em animais experimentais e seres humanos, e a análise espectral dos registros de batimento a batimento da PA tem sido cada vez mais utilizada como uma valiosa ferramenta não-invasiva para avaliar a modulação do sistema nervoso autônomo na FC e PA em ambos animais experimentais (Ceroni et al., 2009; Barbosa Neto et al., 2013; Silva et al., 2009; Hayward et al., 2012; Murphy et al., 1991) e humanos (Silva et al., 2009). Portanto, em um conjunto separado de experimentos, utilizamos a análise espectral para avaliar a contribuição relativa dos tônus simpático e vagal e sua contribuição para as atividades reflexas em SHR tratado cronicamente com kefir, comparado com SHR não tratados e ratos Wistar normotensos. Os nossos dados mostram que a administração de kefir foi capaz de reduzir o componente VLF, que está exacerbado no SHR. A relevância deste achado é que este componente tem sido considerado um marcador da modulação do sistema renina-angiotensina do tônus vasomotor e da PA (Stauss et al., 1995). Os componentes FC-LF e PA-LF, que foram considerados marcadores de atividade neural simpática cardíaca e vascular (Parati et al., 1995, Task Force, 1996), foram significativamente aumentados em SHR, quando comparado com ratos Wistar. Isto está de acordo com outros autores (Ceroni et al., 2009; Barbosa Neto et al., 2013; Silva et al., 2009; Hayward et al., 2012). No entanto, o uso de LF como uma estimativa

da atividade simpática para a atividade cardíaca foi contestado (Reyes del Paso et al., 2013) e considerado como um reflexo de atividades do nervo simpático e parassimpático. O aumento da variabilidade da PA está estreitamente correlacionado com lesão de órgão-alvo em animais normotensos e hipertensos, e esta condição farmacológica reduzida da variabilidade da PA atenua os danos em órgãos (Su et al., 2001 e 2005). Nossos dados mostram que o Kefir administrado por 60 dias em SHR, corrigiu parcialmente o componente LF anormal, sugerindo que ele poderia tornar-se uma alternativa não-farmacológica para a prevenção/tratamento das variabilidades de FC e PA correlacionados com dano em órgãos.

O componente FC-HF, que muitas vezes tem sido considerada um marcador de atividade vagal cardíaco, foi estatisticamente similar em Wistar e SHR, que está de acordo com outros autores (Barbosa Neto et al., 2013; Ceroni et al., 2009). No entanto, esse componente também tem sido afirmado que ele parece não ser exclusivamente atribuído à atividade vagal cardíaca, mas também influenciado pela respiração (Reyes del Paso et al., 2013; Chapleau e Sabharwal, 2011). Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos quando usamos a relação LF/HF para estimar o balanço simpatovagal (Kuwahara et al., 1994; Parati et al., 1995; Task Force, 1996). O tratamento com Kefir não alterou os parâmetros acima. No entanto, o uso da relação LF/HF como uma medida de balanço simpatovagal pode ser enganosa (Chapleau e Sabharwal, 2011).

A relação entre os valores de potência absoluta de FC-LF e PA-LF, o α -índice LF, tem sido utilizado para expressar a sensibilidade do barorreflexo espontâneo (Silva et al., 2009; Dantas et al., 2012). O α -índice LF foi diminuído no SHR, em concordância com outros autores (Silva et al., 2009) e o tratamento com Kefir restaurou esses valores para normais. Conforme descrito por Fazan, 2005, a modulação do barorreflexo pela FC contribui para a LF, mas não para variabilidade de HF que é mediada por ambos os componentes, simpático e parassimpático. Portanto, o aumento da variabilidade da PA, que está estreitamente correlacionada com dano de órgão alvo em condições hipertensivas (Su et al., 2001 e 2005), pode ser melhorada com o tratamento farmacológico (Su et al., 2001; Dias da Silva Valdo et al., 2002) e com intervenções não-farmacológicas, como com o exercício físico (Ceroni et al., 2009) e o tratamento com flavonóides (Monteiro et al., 2012), e agora também poderiam ser considerado (alternativamente ou adicionalmente) os efeitos benéficos do nutriente probiótico Kefir,

como demonstrado no presente estudo, reduzindo a variabilidade da PA e atenuando danos nos órgãos.

6 CONCLUSÃO

Como ilustrado na figura 14, a novidade deste estudo é que a administração crônica diária de Kefir por 60 dias reduziu a pressão arterial, atenuou o tônus simpático cardíaco exacerbado e aumentou o tônus vagal e, conseqüentemente, o ganho do barorreflexo prejudicado, que são características do SHR. Este efeito benéfico também foi confirmado por análise espectral, procedimento não-invasivo.

Portanto, a redução da pressão arterial e o aumento da variabilidade da PA, que estão estreitamente correlacionadas com lesão de órgão-alvo em condições hipertensas, podem ser melhorados com tratamento farmacológico (Su et al., 2001; Dias da Silva Valdo et al., 2002) e com procedimentos não-farmacológicos, tais como o exercício físico (Ceroni et al., 2009; Barbosa Neto et al., 2013), a administração de flavonóides (Monteiro et al., 2012), e agora também poderiam ser considerado (alternativamente ou adicionalmente) os efeitos benéficos do probiótico Kefir.

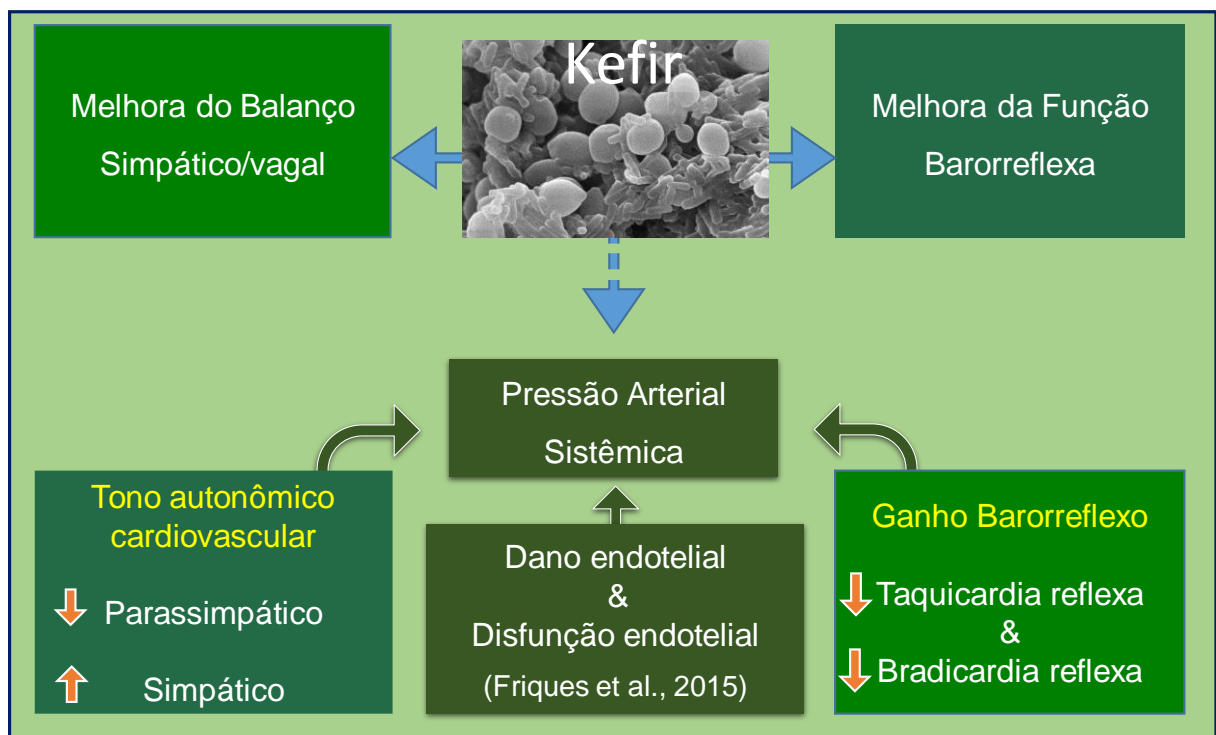


Figura 14. Resumo dos efeitos benéficos da administração crônica de kefir no controle autonômico e disautonomia cardiovascular em SHR.

7 REFERÊNCIAS

- Abboud F. M. The Walter B. Cannon Memorial Award Lecture, 2009. Physiology in perspective: The wisdom of the body. In search of autonomic balance: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010; 298 (6): R1449-1467.
- Abboud F. M., Harwani S. C., Chapleau M. W. Autonomic neural regulation of the immune system: implications for hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension*. 2012; 59 (4): 755-762.
- Adams M. A., Bobik A., Korner P. I. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension: relation to sympathetic function. *Hypertension*. 1989; 4: 1991-202.
- Aires, M.M. et al. Fisiologia. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1335 p.
- Anadón A., Martínez M. A., Ares I., Ramos E., Martínez-Larrañaga M. R., Contreras M. M., Ramos M., Recio I. Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides RYLGY and AYFYPEL, that correspond to fragments (90-94) and (143-149) from α_{s1} -casein. *Food and chemical toxicology*. 2010; 48: 1836-1845.
- Ashizawa N., Seto S., Kitano K., Toyama K., Sasaki H., Kodama K., Hodosa Y., Shimaoka K., Shibata Y., Hashiba K. Effects of blood pressure changes on development and regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy: a 26 year longitudinal study. *Journal of the American College of Cardiology*. 1989;13 (1): 165-172.
- Barbosa Neto O., Abate D. T., Marocolo Júnior M., Mota G. R., Orsatti F. L., Rossi e Silva R. C., Reis M. A., da Silva V. J. Exercise training improves cardiovascular autonomic activity and attenuates renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Sports Science & Medicine*. 2013; 12 (1): 52-59.
- Bernardi L., Ricordi L., Lazzari P., Soldá P., Calciati A., Ferrari M. R., Vandeia I., Finardi G., Fratino P. Impaired circadian modulation of sympathovagal activity in diabetes: A possible explanation for altered temporal onset of cardiovascular disease. *Circulation*. 1992; 86: 1443-1452.

Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed research international*. 2014; 2014: 598271.

Bing O. H. L., Brooks W. W., Robinson K. G. Slawsky M. T., Hayes J. A., Litwin S. E., Sem S., Conrad C. H. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1995; 27: 383-396.

Binkley P. F., Nunziata E., Haas G. J., Nelson S. D., Cody R. J. Parasympathetic withdrawal is an integral component of autonomic imbalance in congestive heart failure: Demonstration in human subjects and verification in a paced canine model of ventricular failure. *Journal am Cell Cardiol*. 1991; 18: 464-472.

Blanco J. H. D., Gastaldi A. C., Gardim C. B., Araujo J. E., Simões M. V., Oliveira L. F. L., Carvalho E. E. V., Souza H. C. D. Chronic cholinergic stimulation promotes changes in cardiovascular autonomic control in spontaneously hypertensive rats. *Autonomic neuroscience: basic and clinical*. 2015; 193: 97-103.

Botelho-Ono M. S., Pina H., Sousa K. H. F., Nunes F. C., Medeiros I. A., Braga V. A. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Autonomic neuroscience: basic and clinical*. 2011; 159: 38-44.

Braga V.A., Burmeister M.A., Sharma R.V., Davisson R.L. Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2008; 295 (4): R1168-R1174.

Cabral A. M., Antonio A., Moyses M. R., Vasquez E. C. Left ventricular hypertrophy differences between male and female renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1988; 21 (3): 633-635.

Campagnaro B. P., Gava A. L., Meyrelles S. S., Vasquez E. C. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. *International journal of hypertension*. 2012; 2012: 968123.

Ceroni A., Chaar L. J., Bombein R. L., Michelini L. C. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Experimental Physiology*. 2009; 94 (6): 630-640.

Chapleau M. W. & Sabharwal R. Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. *Heart Failure Reviews*. 2011; 16 (2): 109-127.

Chapleau M. W., Cunningham J. T., Sullivan M. J., Wachtel R. E., Abboud F. M. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. *Hypertension*. 1995; 26 (2): 341-347.

Chapleau M. W., Li Z., Meyrelles S. S., Ma X., Abboud F. M. Mechanisms determining sensitivity of baroreceptor afferents in health and disease. *Annals New York Academy of Sciences*. 2001; 940: 1-19.

Chapman N., Huxley R., Anderson C., Bousser M. G., Chalmers J., Colman S., Davis S, Donnan G., Macmahon S., Neal B., Warlow C., Woodward M. Effects of a perindopril-based blood pressure-lowering regimen on the risk of recurrent stroke according to stroke subtype and medical history: The progress trial. *Stroke*. 2004; 35: 116-121.

Cicogna A. C., Robinson K. G., Conrad C. H., Squire R., Okoshi M. P., Bing O. H. L. Participação do estado contrátil e do relaxamento miocárdico na disfunção ventricular durante a transição hipertrofia-falência cardíaca. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 1997; 69 (6): 381-384.

Clubb F. J. Jr, Bell P. D., Kriseman J. D., Bishop S. P. Myocardial cell growth and blood pressure development in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Laboratory investigation; a journal of the technical methods and pathology*. 1987; 56(2): 189-197.

Dantas E. M., Pimentel E. B., Andrão R. V., Cichoni B. S., Gonçalves C. P., Zaniqueli D. A., Baldo M. P., Rodrigues S. L., Mill J. G. Carvedilol recovers normal blood pressure variability in rats with myocardial infarction. *Autonomic neuroscience: Basic and clinical*. 2013; 177: 231-236.

Dantas E. M., Sant'Anna M. L., Andrão R. V., Gonçalves C.P., Morra E. A., Baldo M. P., Rodrigues S. L., Mill J. G. Spectral analysis of heart rate variability with the autoregressive method: what model order to choose? *Computers in Biology and Medicine*. 2012; 42 (2): 164-170.

De Angelis K., Santos M. S. B., Irigoyen M. C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*. 2004; XIII (3).

Dias da Silva Valdo J., Viana Públio C. C., de Melo Alves R., Fazan R. Jr, Ruscone T. G., Porta A., Malliani A., Salgado H. C., Montano N. Intravenous amiodarone modifies autonomic balance and increases baroreflex sensitivity in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: basic & clinical*. 2002; 95 (1-2): 88-96.

Dickhout J. G. & Lee R. M. K. W. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Physiology*. 1998; 274 (3): H794-H800.

Diosma G., Romanin D. E., Rey-Burusco M. F., Londero A., Garrote G. L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2014; 30: 43-53.

Doggrell A. S., Brown L. Rats models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular research*. 1998; 39: 89-105.

Duncan B., Schmidt M. I., Giugliani E. R. J. Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseada em evidências. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Fahmy H. A., Ismail F. M. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2015; 144: 85-93.

FAO/WHO, Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1-4 Outubro, 2001.

Farnworth E. R. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology bulletin: Functional Foods*. 2005; 2 (1): 1-17.

Fazan R. Jr, Silva V. J. D., Salgado H. C. Modelos de hipertensão arterial. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001; 8: 19-29.

Fazan R. Jr, de Oliveira M., da Silva V. J., Joaquim L. F., Montano N., Porta A., Chapleau M. W., Salgado H. C. Frequency-dependent baroreflex modulation of blood

pressure and heart rate variability in conscious mice. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2005; 289 (5): H1968-H1975.

Fernandes A. A., Faria T. de O., Ribeiro Júnior R. F., Costa G. P., Marchezini B., Silveira E. A., Angeli J. K., Stefenon I., Vassalo D. V., Lizardo J. H. A single resistance exercise session improves myocardial contractility in spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2015; 48 (9): 813-821.

Frigues A. G., Arpini C. M., Kalil I. C., Gava A.L., Leal M. A., Porto M. L., Nogueira B. V., Dias A. T., Andrade T.U., Pereira T. M., Meyrelles S. S., Campagnaro B. P., Vasquez E. C. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Translational Medicine*. 2015; 13 (1): 390.

Gava A. L., Peotta V. A., Cabral A. M., Vasquez E. C., Meyrelles S. S. Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008; 86 (7): 458–464.

Gerritsen J., Dekker J. M., TenVoorde B. J., Kostense P. J., Heine R. J., Bouter L. M., Heethaar R. M., Stehouwer C. D. A. Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease. *Diabetes care*. 2001; 24: 1793-1798.

Gómez-Guzmán M., Toral M., Romero M., Jiménez R., Galindo P., Sánchez M., Zarzuelo M. J., Olivares M., Gálvez J., Duarte J. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2015; 59 (11): 2326-2336.

Gray, S. D. Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biology of the Neonate*. 1984; 45 (1): 25-32.

Hamet M. F., Londero A., Medrano M., Vercammen E., Van Hoorde K., Garrote G. L., Huys G., Vandamme P., Abraham A. G. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiology*. 2013; 36 (2): 327–334.

Hayward L. F., Castellanos M., Noah C. Cardiorespiratory variability following repeat acute hypoxia in the conscious SHR versus two normotensive rat strains. *Autonomic Neuroscience: basic & clinical*. 2012; 171 (1-2): 58-65.

Hertzler S. R., Clancy S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*. 2003; 103 (5): 582-587.

Hong W., Chen Y., Chen M. The antiallergic effect of kefir lactobacilli. *Journal of Food Science*. 2010; 75 (8): H244-H253.

Huseini H. F., Rahimzadeh G., Fazeli M. R., Mehrasma M., Salehi M. Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*. 2012; 38: 719-723.

Irigoyen M. C, Consolim-Colombo F. M., Krieger E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2001; 8: 55-62.

Irigoyen M. C., Lacchini S., De Angelis K., Michelini L. C. Fisiopatologia da hipertensão arterial: o que avançamos? *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. 2003; 1: 20-45.

Ismaiel A. A., Ghaly M. F., El-Naggar A. K. Milk kefir: Ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by aspergillus flavus. *Current Microbiology*. 2011; 62: 1602-1609.

Jakala P., Pere E., Lehtinen R., Turpeinen A., Korpela R., Vapaatalo H. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009; 60 (4): 11–20.

Javkhedkar A. A. & Banday A. A. Antioxidant resveratrol restores renal sodium transport regulation in shr. *Physiological reports*. 2015; 3 (11): e12618.

Just A., Faulhaber J., Ehmke H. Autonomic cardiovascular control in conscious mice. *American Journal Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2000; 279: R2214-R2221.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365: 217-223.

Kuwahara M., Yayou K., Ishii K., Hashimoto S., Tsubone H., Sugano S. Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat. *Journal of Electrocardiology*. 1994; 27 (4): 333-337.

La Rovere M. T., Pinna G. D., Maestri R., Sleight P. Clinical value of baroreflex sensitivity. *Netherlands Heart Journal*. 2013; 21: 61-63.

Laragh J. H. The renin system and four lines of hypertension research. Nephron heterogeneity, the calcium connection, the prorenin vasodilator limb, and plasma renin and heart attack. *Hypertension*. 1992; 20 (3): 267-279.

Leite A. M. O., Mayo B., Rachid C. T. C. C., Peixoto R. S., Silva J. T., Paschoalin V. M. F., Delgado S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food microbiology*. 2012; 31: 205-221.

Leite A. M. O., Miguel M. A. L., Peixoto R. S., Rosado A. S., Silva J. T., Paschoalin V. M. F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013; 44 (2): 341-349.

Lewandowski J. [Renovascular hypertension: is it only the top of the iceberg?]. *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2003; 15 (88): 371-376.

Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezabal N., Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 2006; 23: 67-74.

Lu M., Wang X., Sun G., Qin B., Xiao J., Yan S., Pan Y., Wang Y. Fine structure of Tibetan kefir grains and their yeast distribution, diversity, and shift. *PLoS One*. 2014; 9 (6): e101387.

Masson G. S., Nair A. R., Soares P. P. S., Michelini L. C., Francis J. Aerobic training normalizes autonomic dysfunction, HMGB1 content, microglia activation and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus of SHR. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2015; 309 (7): H1115-H1122.

Mengal V. Efeitos do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a sensibilidade barorreflexa e estresse oxidativo de ratos com hipertensão renovascular. Dissertação

de Mestrado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de ciências da saúde, 2015.

Meyrelles S. S., Mill J. G., Cabral A. M., Vasquez E. C. Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 1996; 60: 163-168.

Meyrelles S. S., Cabral A. M., Vasquez E. C. Contribuição do reflexo cardiopulmonar na regulação cardiovascular. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 1994; 62 (2): 123-130.

Monteiro M. M., França-Silva M. S., Alves N. F., Porpino S. K., Braga V. A. Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Molecules*. 2012; 17 (11): 12997-3008.

Montezano A. C., Touyz R. M. Molecular mechanisms of hypertension – reactive oxygen species and antioxidants: A basic science update for the clinician. *Canadian Cardiovascular Society*. 2012; 28: 288-295.

Moreira E. D., Mostarda C. T., Moraes-Silva I. C., Ferreira J. B., Santos F., Lacchini S., De Angelis K., Rodrigues B., Irigoyen M. C. Effect of sinvastatin in the autonomic system is dependente on the increased gain/sensitivity of the barorreceptores. *Physiological Reports*. 2013; 1(3): e00045.

Moyses M. R., Cabral A. M., Marcal D., Vasquez E. C. Sigmoidal curve-fitting of baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1994b; 27 (6): 1419–1424.

Moyses M. R., Cabral A. M., Bissoli N., Vasquez E. C. Time course of changes in sigmoidal-fitting baroreceptor curves in one-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*. 1994a; 23 (1 Suppl): I87- I92.

Murphy C. A., Sloan R. P., Myers M. M. Pharmacologic responses and spectral analyses of spontaneous fluctuations in heart rate and blood pressure in SHR rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1991; 36 (3): 237-50.

Nielsen B., Gürakan G. C., Ünlü G. Kefir: A multifaceted fermented dairy product. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 2014; 6: 123-135.

Okamoto K. & Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*. 1963; 27: 282-293.

Ostadrahimi A., Taghizadeh A., Mobasser M., Farrin N., Payahoo L., Beyramalipoor G. Z., Vahedjabbari M. Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Iran Journal Public Health*. 2015; 44 (2): 228–237.

Parati G., Saul J. P., Di Rienzo M., Mancia G. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension*. 1995; 25 (6): 1276–1286.

Peotta V. A., Gava A. L., Vasquez E. C., Meyrelles S. S. Evaluation of baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007; 85 (8): 761–766.

Punaro G. R., Maciel F. R., Rodrigues A. M., Rogero M. M., Bogsan C. S. B., Oliveira M. N., Ihara S. S. M., Araujo S. R. R., Sanches T. R. C., Andrade L. C., Higa E. M. S. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. *Nitric Oxide*. 2014; 37: 53-60.

Reyes del Paso G. A., Langewitz W., Mulder L. J., Van Roon A., Duschek S. The utility of low frequency heart rate variability as an index of sympathetic cardiac tone: a review with emphasis on a reanalysis of previous studies. *Psychophysiology*. 2013; 50 (5): 477-87.

Ribeiro R. M., Pinheiro Neto V. F., Ribeiro K. S., Vieira D. A. Abreu I. C., Silva Sdo N., Cartágenes Mdo S., Freire S. M., Borges A. C., Borges M. O. Antihypertensive effect of *Syzygium cumini* in spontaneously hypertensive rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2014; 2014.

Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A. F., Astiazaran-García H., Hernández-Mendoza A., Vallejo-Cordoba B. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *American Dairy Science Association*. 2013; 96: 4094-4099.

Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A. F., Astiazaran-García H., Vallejo-Cordoba B. Hypotensive and heart rate lowering effects in rats receiving milk

fermented by specific lactococcus lactis strains. *British Journal of Nutrition*. 2012; 109: 927-833.

Sakar S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*. 2007; 109 (4): 280-290.

Sanjuliani A. F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. *Revista da SOCERJ*. 2002; 15 (4): 210-218.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2010. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Disponível em Rev Bras Hipertens vol.17(1):7-10, 2010 / http://www.anad.org.br/profissionais/images/VI_Diretrizes_Bras_Hipertens_RDHA_6_485.pdf Acesso 04/01/2016.

Schunkert H., Dzau V. J., Tang S. S., Hirsch A. T., Apstein C. S., Lorell B. H. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression. In pressure overload left ventricular hypertrophy: effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *The Journal of a Clinical Investigation*, 1990; 86: 1913-1920.

Serafini F., Turrone F., Ruas-Madiedo P., Lugli G. A., Milani C., Duranti S., Zamboni N., Bottacin F., Sinderen D., Margolles A., Ventura M. Kefir fermented milk and kefir promote growth of bifidobacterium bifidum PRL2010 and modulate its gene expression. *International Journal of Food Microbiology*. 2014; 178: 50-59.

Shimojo G. L., Palma R. K., Brito J. O., Sanches I. C., Irigoyen M. C., De Angelis K. Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2015; 48 (6): 523-527.

Silva G. J., Ushizima M. R., Lessa P. S., Cardoso L., Drager L. F., Atala M. M., Consolim-Colombo F. M., Lopes H. F., Cestari I. A., Krieger J. E., Krieger E. M. Critical analysis of autoregressive and fast Fourier transform markers of cardiovascular variability in rats and humans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009; 42 (4): 386-96.

Silva I. C. M. Efeitos do treinamento físico aeróbio nas adaptações hemodinâmicas, autonômicas e morfofuncionais cardíacas da hipertensão espontânea: influência do

barorreflexo. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.

Sociedade brasileira de hipertensão. 2004. Revista da sociedade brasileira de hipertensão. Disponível em: *Revista da sociedade Brasileira de Hipertensão*. vol. 7 (3); 86-89.

Stauss H. M., Mrowka R., Nafz B., Patzak A., Unger T., Persson P. B. Does low frequency power of arterial blood pressure reflect sympathetic tone? *Journal of Autonomic Nervous System*. 1995; 54 (2): 145-54.

Su D.F., Miao C.Y. Blood pressure variability and organ damage. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2001; 28: 709-715.

Su, D.F., Miao, C.Y. Reduction of blood pressure variability: a new strategy for the treatment of hypertension. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005; 26 (8): 388-390.

Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal*. 1996; 17 (3): 354–381.

Thayer J. F., Yamamoto S. S., Brosschot J. F. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *International journal of cardiology*. 2010; 141: 122-131.

Uchida M., Ishii I., Inoue C., Akisato Y., Watanabe K., Hosoyama S., Toida T., Ariyoshi N., Kitada M. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2010; 17 (9): 980-988.

Varin R., Mulder P., Tamion F., Richard V., Henry J. P., Lallemand F., Lerebours G., Thuillez C. Improvement of endothelial function by chronic angiotensi-converting enzyme inhibition in heart failure: role of nitric oxide, prostanoids oxidant stress, and bradykinin. *Circulation*. 2000; 102: 351-356.

Vasquez E. C., Cunha R. S., Cabral A. M. Baroreceptor reflex function in rats submitted to chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1994; 27: 767-774.

Vasquez E. C., Meyrelles S. S., Mauad H., Cabral A. M. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997;30 (4): 521-32.

Vasquez E. C., Peotta V. A., Meyrelles S. S. Cardiovascular autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2012; 29 (5-6): 635-46.

WHO, World Health Organization. 2013. A global brief on hypertension. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf?ua=1 Acesso 05/01/2016.

Wszolek M., Kupiec-Teahan B., Guldager H.S., Tamine A.Y. Production of kefir, koumiss and other related products. Ucrânia: Blackwell Science Ltd., 2006. Cap. 8, p. 174-2016.

Yan L., Tan X., Chen W., Zhu H., Cao J., Liu H. Enhanced vasoconstriction to α_1 adrenoceptor autoantibody in spontaneously rats. *Science China Life Sciences*. 2014; 57: 681-689.

Yener A. U., Sehitoglu M. H., Ozkan M. T., Bekler A., Ekin A., Cokkalender O., Deniz M., Sacar M., Karaca T., Ozcan S., Kurt T. Effects of kefir on ischemia-reperfusion injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015; 19 (5): 887–96.

Zhang S., Li Y., Li H., Zheng X., Chen X. Renal-protective effect of nicousamide on hypertensive nephropathy in spontaneously hypertensive rats. *Biomedical reports*. 2013; 1:30-40.

Zhuo J. L., Ferrao F. M., Zheng Y., Li X. C. New frontiers in the intrarenal renin-angiotensin system: a critical review of classical and new paradigms. *Frontiers in Endocrinology*. 2013; 4: 166.